

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchungen zum Stoffwechsel
von Neoprontosil
an der isolierten Rattenleber**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Regine Jonen-Kern geb. Kern
aus Königsberg

Mainz 1974

1975

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchungen zum Stoffwechsel
von Neoprontosil
an der isolierten Rattenleber**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Regine Jonen-Kern geb. Kern
aus Königsberg

Mainz 1974



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein.

Referent: Professor Dr. G. F. Kahl

Korreferent: Professor Dr. K. J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 1. 1975

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ZIEL DER ARBEIT	11
METHODEN	13
1. Tiermaterial	13
2. Vorbehandlung der Tiere	13
3. Präparation der isolierten Leber	13
4. Perfusionsmedium	14
5. Vorbereitung der Versuche	14
6. Perfusionstechnik	14
7. Herstellung der Gasgemische	15
8. Genereller Versuchsablauf	15
9. Durchführung der Einzelversuche	15
10. Kontrollversuche	16
11. Quantitative Bestimmung von Neoprontosil und Sulfanilamid	16
12. Atmungsgröße des isolierten Organs	18
13. Substanzen	18
ERGEBNISSE	19
1. Abhängigkeit der Neoprontosilreduktion vom Sauerstoffgehalt des Perfusionsmediums	19
2. Reduktion von Neoprontosil in Gegenwart von Metyrapon und Äthanol	22
3. Hemmung der Neoprontosilreduktion durch Kohlenmonoxid und ihre Reaktivierung durch Metyrapon	24
4. Metabolisierung von Sulfanilamid	26
5. Vergleich der Veränderung der Neoprontosilkonzentration im Perfusionsmedium mit der Sulfanilamidbildung	27
6. Einfluß einer Vorbehandlung mit Phenobarbital auf die Konzentration von freiem Sulfanilamid im Medium	29
DISKUSSION	30
1. Sauerstoffempfindlichkeit des reduktiven Stoffwechsels von Neoprontosil	30
2. Azospaltung von Neoprontosil an der isolierten Leber in Gegenwart von Metyrapon bzw. Äthanol	33

	Seite
3. Hemmung der Neoprontosilreduktion durch Kohlenmonoxid und ihre Reaktivierung durch Metyrapon	34
4. Vergleich der Konzentrationen von Neoprontosil und freiem Sulfanilamid im Perfusionsmedium der isolierten Leber	35
ZUSAMMENFASSUNG	38
LITERATURVERZEICHNIS	40

EINLEITUNG

Für den Abbau körperfremder Stoffe stehen dem menschlichen Organismus verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung. Zu ihnen zählen die Oxydation, Reduktion und Hydrolyse sowie meist in einer Folgereaktion die Konjugation. Die Katalyse dieser Reaktion erfolgt durch Enzyme, die mit chemisch sehr verschiedenen Substraten in gleicher Weise zu reagieren vermögen. Diese Fermentreaktionen führen zu Umwandlungsprodukten, die für den Organismus indifferent sein können oder aber pharmakologische oder toxikologische Bedeutung gewinnen. Meist resultiert die Bildung polarer Metabolite, die im Vergleich zur lipophilen Ausgangssubstanz, welche das Arzneimittel im allgemeinen darstellt, eine bessere Wasserlöslichkeit und damit Ausscheidungsfähigkeit besitzen.

Die quantitativ entscheidende Rolle für den Arzneimittelabbau spielt die Leber. In dem endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle findet sich ein Enzymsystem, das neben der Reduktion hauptsächlich die Oxydation zahlreicher Fremdstoffe katalysiert (Gillette, 1963). Die subzelluläre Fraktion dieser katalytischen Aktivitäten, die sogenannten Mikrosomen, läßt sich durch Ultrazentrifugation gewinnen (Claude, 1938; Palade, 1956). Die für das mikrosomale Enzymsystem typischen Transformationen sind aromatische und aliphatische Hydroxylierung, N- und O-Desalkylierung sowie S-Demethylierung; weiterhin die oxydative Desaminierung und die Sulfoxidbildung (Brodie und Axelrod, 1948; Brodie et al., 1958; Pechthold, 1964; Axelrod, 1955; Netter, 1960; Gillette und Kamm, 1960).

Alle vom mikrosomalen Enzymsystem katalysierten oxydativen Reaktionen benötigen Sauerstoff und NADPH (Axelrod, 1955; LaDu et al., 1955; Mitoma et al., 1956; Gillette et al., 1957). Die Arbeitsweise dieses Enzymsystems ist der mitochondrialen Atmungskette vergleichbar. Der Elektronentransport erfolgt vom NADPH über ein Flavoprotein und möglicherweise ein noch unbekanntes Protein auf die Endoxydase. Diese übernimmt die Doppelfunktion der Aktivierung des Sauerstoffs und der Bindung des Substrates. Während eines Redoxzyklus der Endoxydase wird ein Atom des molekularen Sauerstoffs zu Wasser reduziert, das andere

aber dem Substrat oder einem von diesem abgespaltenen Teil als Hydroxylgruppe vermittelt. Als erster beschrieb Mason (1957) diese Reaktion als mischfunktionelle Oxydation.

Die Endoxydase der mischfunktionellen Oxydation wurde zunächst als "Kohlenmonoxid-bindendes Pigment" entdeckt (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958), da es in seiner reduzierten Form mit Kohlenmonoxid einen Komplex bildet, der bei der Wellenlänge 450 nm im Differenzspektrum ein Absorptionsmaximum besitzt (Estabrook et al., 1963). Da dieser Zellfarbstoff chemisch einem Hämoprotein entspricht, wurde es Cytochrom P-450 genannt (Omura und Sato, 1962). Die Hemmung der Hydroxylierung vieler Pharmaka durch Kohlenmonoxid wurde als Bindung des Kohlenmonoxids an das Cytochrom P-450 interpretiert (Estabrook et al., 1963).

Die Benennung des Flavoproteins als "NADPH-Cytochrom c-Reduktase" beinhaltet dessen Fähigkeit, oxydiertes Cytochrom c zu reduzieren. Durch das Angebot von oxydiertem Cytochrom c als unter physiologischen Bedingungen in den Mikrosomen nicht vorkommender Wasserstoffakzeptor läßt sich die mikrosomale Hydroxylierung hemmen, da Reduktionsäquivalente verloren gehen (LaDu et al., 1955).

Ein analoger Elektronentransport vom NADH durch ein Flavoprotein, die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, auf das Cytochrom b_5 ist ebenfalls in den Mikrosomen möglich (Strittmatter und Ball, 1954). Eine Beteiligung dieses Systems an der mischfunktionellen Oxydation ist denkbar (Hildebrandt und Estabrook, 1971).

Als ein weiteres Charakteristikum der mikrosomalen Enzymaktivitäten gilt deren Stimulierbarkeit durch Vorbehandlung der Tiere mit bestimmten Fremdstoffen. Nach ersten Versuchen von Brown et al. (1954) sind heute zahlreiche Substanzen chemisch sehr unterschiedlicher Natur für ihren enzyminduzierenden Effekt bekannt (Conney, 1967). Als Prototypen sind Phenobarbital einerseits und zyklische Kohlenwasserstoffe, z.B. 3-Methylcholanthren, andererseits zu nennen. Als Ursache des Induktionseffektes gilt die Zunahme der mikrosomalen Eiweißsynthese nach Phenobarbital bzw. des Gesamtleberproteins

nach 3-Methylcholanthren (Remmer und Merker, 1963; Arcos et al., 1961).

Im einzelnen ist der Grund der Bevorzugung bestimmter induzierender Substanzen für unterschiedliche Abbauege ungeklärt.

Den zahlreichen oxydativen Stoffwechselwegen stehen nur wenige Abbauege reduktiver Natur gegenüber. Dabei gewinnen die Nitro- und Azoreduktion auf Grund ihrer chemotherapeutischen und toxikologischen Aspekte ein besonderes Interesse. So führte die Entdeckung der reduktiven Spaltung des Prontosils (Sulfachrysoidin) in Triaminobenzol und Sulfanilamid (Trefouel et al., 1935; Domagk, 1935) zu einer ganzen Reihe von Derivaten des Sulfanilamids, den Sulfonamiden.

Andererseits gilt als Ursache der durch bestimmte aromatische Nitroverbindungen und aromatische Amine hervorgerufenen Methämoglobinämie die Umwandlung der korrespondierenden Hydroxyphenyl- und Nitrosoverbindungen durch reduktiven Abbau (Kiese et al., 1957). Viele Azofarbstoffe sind weiterhin bekannt für ihre carcinogene und insectizide Wirkung, ohne daß ausgeschlossen wurde, ob diese Eigenschaften nicht durch Metabolite der Azofarbstoffe ausgelöst werden. Die Frage der Umwandlung in toxische oder carcinogene Produkte stellt sich auch bei den zahlreichen synthetischen Farbstoffen, die als Nahrungsmittelzusätze oder in der Kosmetikindustrie im Handel sind.

Am Beispiel des 4-Dimethylaminoazobenzols beschrieben Mueller und Miller (1949) eine reduktive Spaltung. Das zugehörige Azobrücken spaltende Enzym lokalisierten diese Autoren intrazellulär. Darüberhinaus zeigte sich eine spezifische Abhängigkeit dieser Azoreduktase von NADPH als Cofaktor (Mueller und Miller, 1949; Fouts et al., 1957). Produkte des reduktiven Abbaus von 4-Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb) sind primäre Amine (Sisley und Porcher, 1911; Fuller, 1937; Stevenson et al., 1942; Elson und Warren, 1944).

Inzwischen konnten diese Aussagen: Abhängigkeit von NADPH als Cofaktor und Bildung primärer Amine als Endprodukte der Azoreduktion - auch auf andere Azofarbstoffe übertragen werden, so auf Orange III und IV, Azobenzol (Fouts et al., 1957), "sunset yellow" (1-p-Sulfophenylazo-2-naphthol-6-schwefelsäure) (Burba, 1968), sowie auch auf das historische Beispiel des Sulfachrysoidin bzw. Prontosil (Fouts et al., 1957). Neben den primären

Aminen als Endprodukten der Azoreduktion fanden Fouts und Mitarbeiter (1957) Hydrazoverbindungen als Zwischenprodukte, wie es schon früher vermutet worden war (Elson und Warren, 1944; Mueller und Miller, 1950; Bray et al., 1951). Da diese Hydrazoverbindungen empfindlich gegen Luftsauerstoff sind (Fieser und Fieser, 1956), lag es nahe, für die vom jeweiligen Substrat abhängige Hemmbarkeit der Azoreduktion durch Sauerstoff (Fouts et al., 1957; Kamm und Gillette, 1963) diese Hydrazoverbindungen verantwortlich zu machen (Hernandez et al., 1967, a). Dieser Vermutung liegt die Vorstellung einer Reoxydation der Hydrazoverbindungen zugrunde; hierdurch würde vermehrt NADPH verbraucht und dieser Cofaktorschwund müßte die weitere Reduktion zum primären Amin erschweren. Die Bedeutung von NADPH für die Azoreduktase unterstreicht auch die Beobachtung von Fouts et al. (1957), daß NADPH sowohl in der löslichen Phase des Leberhomogenates nach Dialyse die Prontosilreduktion ermöglicht als auch für die mikrosomale Reduktion erforderlich ist. Bei diesen Versuchen hatte NADH keinen Effekt. Konzentrationen von NADPH, die 0,1 mM übersteigen, reduzieren Neoprontosil nichtenzymatisch (Hernandez et al., 1967, a). Neoprontosil ist eine dem Prontosil chemisch nahestehende, aber stärker wasserlösliche Azoverbindung (Gingell et al., 1971).

Der überraschende Befund der nichtenzymatischen Reduktion (Hernandez et al., 1967, a) verweist auf die Theorie von Adamson et al. (1965), daß die Azo- und Nitroverbindungen sowie deren Intermediärverbindungen als unspezifische Wasserstoffakzeptoren dienen können. Die Spezifizierung der Wasserstoffdonatoren erklärt sich aus der Aktivitätssteigerung der Azoreduktasen durch die Anwesenheit von Flavinen (FMN, FAD, Riboflavin) (Shargel und Mazel, 1968; Shargel, 1967; Fouts et al., 1957; Ketterer et al., 1970). Auch die Reduktion von p-Nitrobenzoat läßt sich in vitro durch Flavine steigern. Auch hierbei wird den Flavinen die Rolle des künstlichen Elektronencarriers vom NADPH auf das Substrat zugewiesen (Fouts und Brodie, 1957).

Ein interessantes Analogon gibt es auf der Ebene der bakteriellen Reduktase: *Proteus vulgaris*-Kulturen zeigen nach Alterung eine Zunahme der Azoreduktaseaktivität verbunden mit einer Konzentrationserhöhung des Riboflavingehaltes im Kulturmedium (Roxan et al., 1967).

Der Hauptsitz der Azoreduktion wurde in der Leber vermutet (Bernheim, 1941). Tatsächlich liegen die relativen Aktivitäten der Prontosilreduktion bei der Annahme einer 100%-igen Aktivität in der Leber bei 28% in der Niere, 17% in der Lunge, 12% im Herzen und 8% im Gehirn (Fouts et al., 1957).

Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung der Enzymaktivität der Azoreduktase zeigen bei Fouts und Mitarbeitern (1957) übereinstimmend mit den Ergebnissen von Hernandez et al. (1967, a) die größte Aktivität im Gesamthomogenat. Während die Aktivitäten in der löslichen Fraktion differierende Messungen ergeben, finden beide Autorengruppen ohne Zusatz von Cofaktoren keine Azoreduktaseaktivitäten in der mikrosomalen Fraktion. Nach Zugabe geringer Mengen von NADPH gewinnt die mikrosomale Fraktion ca. 50% der Gesamtaktivität. Die zusätzliche Anwesenheit geringer Anteile der gekochten löslichen Fraktion bewirkt den Gewinn der vollen Aktivität wie im Gesamthomogenat. Ersetzt man hierbei die lösliche Fraktion durch das darin enthaltene EDTA ($10^{-3}M$), so läßt sich ebenfalls die volle Aktivität ermitteln (Hernandez et al., 1967, a). Dieses ließe sich mit dem Einfluß geringer Mengen von Metallen auf die Sulfhydrylgruppen der Enzyme erklären.

Die in der nicht denaturierten löslichen Fraktion vorhandene Aktivität hat entweder die Bedeutung eines zusätzlichen Anteiles der Azoreduktase (Hernandez et al., 1967, a), oder aber es verbirgt sich hinter dieser Aktivität die Wirkung einer Klasse leichter Mikrosomen, die ungewöhnlich langsam sedimentieren (Fouts, 1961).

Während die Hydroxylierung vieler Pharmaka durch Kohlenmonoxid stark gehemmt wird (Estabrook et al., 1963), hemmt Kohlenmonoxid die Neoprontosilreduktion durch Rattenlebermikrosomen nur um ca. 30-40% (Wright und Gillette, 1964; Hernandez et al., 1967, a). Diese Hemmung ist nichtkompetitiv; es darf auch nicht auf eine direkte Elektronenübertragung vom Cytochrom P-450 auf das Substrat geschlossen werden (Sasame, unveröffentlicht; zit. nach Gillette, 1971). Andererseits darf die Kohlenmonoxidhemmbarkeit auch nicht als beweisend für die Beteiligung des Cytochrom P-450 an der Reduktion angesehen werden, da auch andere Enzyme durch Kohlenmonoxid gehemmt werden, zum Beispiel die Tyrosinase (Keilin und Mann, 1938); die Glutaminsäuredehydrogenase (Adelstein und Vallee, 1958) und die β -Phenyläthylaminhydroxylase (Friedman und Kaufman, 1965).

Juchau (1969) macht gegen eine unmittelbare Deutung der Kohlenmonoxid-hemmbarkeit als Beteiligung des Cytochrom P-450 geltend, daß die p-Nitrobenzoat-Reduktion nach Hitzedenaturierung der Enzymproteine durch Kohlenmonoxid hemmbar bleibt.

Ein Enzym, dessen Aktivität durch Kohlenmonoxid nicht verändert wird, ist die NADPH-Cytochrom c-Reduktase (Hernandez et al., 1967, a). In diesem Flavoprotein vermuten Mueller und Miller (1949) eine möglicherweise als Azoreduktase wirksame Aktivität, die von Hernandez et al. (1967, a) bestätigt wurde. Die Azoreduktase gleicht mit einem Molekulargewicht zwischen 33000 und 45000 und den entsprechenden spektralen Charakteristiken einem Flavoprotein. Dieselben Autoren fanden weiterhin eine gleich hohe K_M (NADPH) der gereinigten Azoreduktase für Neoprontosil wie mit gereinigter NADPH-Cytochrom c-Reduktase für das Cytochrom c.

In enger Analogie zum oxydativen Stoffwechsel läßt sich wiederum die Neoprontosilreduktion durch Vorbehandlung steigern. Diese Induktion zeigt sich für die Azoreduktase nach Phenobarbital und Iproniazid (Conney et al., 1960) sowie nach 3-Methylcholanthren (Mazel und Hernandez, 1967).

Während die Phenobarbitalvorbehandlung die NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und die Neoprontosilreduktion in den Lebermikrosomen proportional zum Cytochrom P-450-Gehalt steigert (Hernandez et al., 1967, b), wird nach 3-Methylcholanthren-Vorbehandlung die Azoreduktaseaktivität nicht proportional zum Anstieg des Cytochrom P-450-Gehaltes erhöht (Conney et al., 1956) - die NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität wird nicht verändert (v. d. Decken und Hultin, 1960).

Als drei mögliche Formen der Azoreduktase stellen sich demnach dar:

1. eine kohlenmonoxidhemmbare Form, die durch Solubilisierung zerstörbar ist und dem Cytochrom P-450 entsprechen könnte;
2. eine kohlenmonoxidinsensible Form, die nach Solubilisierung erhalten bleibt und die Charakteristika der NADPH-Cytochrom c-Reduktase erfüllt;
3. ein 3-Methylcholanthren-induzierbarer Weg, der durch Kohlenmonoxid wiederum nicht beeinflußt wird, aber nach Solubilisierung nicht erhalten bleibt.

Ein möglicher vierter Weg über die Mitwirkung von NADH, Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase wird noch diskutiert (Hernandez et al., 1967, b)

Eine Steigerung der Azoreduktase in vitro ohne Vorbehandlung bei "sunset yellow" zeigte sich in Anwesenheit von Nitrofurantoin (Burba, 1968). Auch das Hungernlassen der Versuchstiere steigert die Aktivität der Azo-, wie auch der Nitroreduktase (Dixon et al., 1960).

Außer dieser Azoreduktion erfolgt auch im Darm, katalysiert durch Bakterienflora, eine Spaltung von Azoverbindungen (Goldberg, 1967; Walker, 1970). Wird die Darmflora durch die Gabe von Antibiotika (Neomycinsulfat, Tetracyclinhydrochlorid, Bacitracin) ausgeschaltet, so wird die Sulfanilamidbildung aus Prontosil und Neoprontosil entsprechend vermindert (Gingell et al., 1969). Dabei ist Neoprontosil stärker betroffen als Prontosil, weil das weniger lipoidlösliche Neoprontosil in geringerem Umfang als Prontosil resorbiert und schneller in die Galle ausgeschieden wird.

Azo- und Nitroreduktion zeigen viele Gemeinsamkeiten. Fouts und Mitarbeitern (1957) gelang es, durch Aussalzung die Azoreduktase teilweise von der Nitroreduktase abzutrennen. Auch die Nitroreduktion benötigt NADPH als Cofaktor (Gillette, 1966); in einem geringeren Ausmaß dient auch NADH als Wasserstoffdonator (Fouts und Brodie, 1957). Dabei ist die NADH-Abhängigkeit größer im Überstand und in einem ersten Schritt der Reaktion, wie es für die Bildung von p-Nitrosobenzoessäure aus p-Nitrobenzoessäure nachgewiesen wurde (ebd.). Der zweite Schritt der Reaktion, die Reduktion der Nitrosobenzoessäure zur p-Hydroxyaminobenzoessäure, ist NADPH-abhängig und hauptsächlich in den Mikrosomen lokalisiert. Dieser zweite Schritt ist durch Sauerstoff hemmbar und aktivierbar durch Flavine; er stellt eventuell den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Gesamtreaktion dar.

Entsprechend dieser Zuordnung der Aktivitäten zu bestimmten Fraktionen ist auch nur die mikrosomale Aktivität durch Phenobarbitalvorbehandlung (Kato und Oshima, 1968) oder DDT-Vorbehandlung (Carlson und DuBois, 1970) stimulierbar.

Möglicherweise besteht auch eine Beziehung zwischen der mikrosomalen NADPH-Oxydase und der Nitroreduktase (Kamm und Gillette, 1963). Auch die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase könnte zum Teil für die Nitroreduktaseaktivität mitverantwortlich sein (Gillette, 1963). Die nichtenzymatische Nitroreduktion macht nur einen sehr geringen Teil der Gesamtaktivität aus (Carlson und DuBois,

1970). Die intrazelluläre Verteilung der Nitroreduktaseaktivität zwischen Mikrosomen und der löslichen Fraktion ist nach Fouts und Brodie (1957) gleich, wobei auch Kerne und Mitochondrien nicht identifizierte Aktivitäten der Nitroreduktase enthalten. Weiterhin sind Teilaktivitäten der Nitroreduktase auch für die NADPH-Cytochrom c-Reduktase (Feller et al., 1971) sowie für die Xanthinoxidase (Morita et al., 1971) nachgewiesen.

Am Beispiel der p-Nitrobenzoesäure zeigten Sasame und Gillette (1969) die Steigerung der Nitroreduktion durch Typ I-Substrate, eine Hemmung aber durch Typ II-Substrate. Typ I- und Typ II-Substrate sind chemisch unterschiedliche Verbindungen, deren Klassifizierung auf Grund gleicher Bindungsspektren mit dem oxydierten Cytochrom P-450 erfolgte (Remmer et al., 1966; Schenkman et al., 1967).

Wegen ihrer Bedeutung für die Frage nach der Beteiligung des bekannten mikrosomalen Enzymsystems am reduktiven Abbau gewinnen Ergebnisse zur Steroidreduktion ihre zusätzliche Bedeutung.

Während die Beteiligung des Cytochrom P-450 an der C_{11} -Steroidhydroxylase in den Mitochondrien der Nebennierenrinde nachgewiesen werden konnte (Estabrook et al., 1963), finden Bahr und Mitarbeiter (1969) keinen Hinweis für eine Einflußnahme des Cytochrom P-450 auf die Reduktion von Steroiden. Am Beispiel des 4-Androsten-3, 17-dion zeigte diese Arbeitsgruppe, daß Kohlenmonoxid die 5-Reduktion am C_5 -Atom des Steroidgerüsts nicht verändert. Die Zugabe von oxydiertem Cytochrom c hemmte die Bildung oxydierter Metabolite, bedingte jedoch eher eine Steigerung der Androstendionreduktion. Während die Steroidhydroxylierung durch anaerobe Bedingungen in den Lebermikrosomen um mehr als 90% gehemmt wird, bleiben die reduktiven Aktivitäten im wesentlichen unverändert. Nur die Phenobarbitalvorbehandlung vermag in gleicher Weise die Hydroxylierung und die Reduktion von Androstendion in vitro zu steigern (Bahr et al., 1969).

Eine Substanz, die durch ihre Hemmwirkung auf die 11β -Steroidhydroxylase in der Nebennierenrinde klinische Bedeutung erhielt (Liddle et al., 1958; 1959), ist das Metyrapon. Für diese Substanz ist ebenfalls ein reduktiver Stoffwechsel beschrieben. Der Hauptmetabolit des Metyrapon ist das an der aliphatischen Ketogruppe

reduzierte Metyrapon (Sprunt et al., 1967; Kraulis et al., 1968). Eine nähere Analyse dieses reduktiven Stoffwechsels erfolgte durch Kahl (1970). Dabei konnte der bekannte Metabolit einer NADPH-abhängigen Reaktion zugeordnet und von einem weiteren Metaboliten im 105000 x g-Überstand abgetrennt werden (Düges und Kahl, 1970), dessen Bildung in vitro durch Sauerstoff hemmbar erscheint - nicht jedoch in der isoliert perfundierten Rattenleber (Lelling, 1971). Die mikrosomale Metyraponreduktase wird durch Kohlenmonoxid nicht verändert, was den Ergebnissen bei der Steroidreduktion entspricht (Bahr et al., 1969), jedoch von den Ergebnissen der Azo- (Wright und Gillette, 1964; Hernandez et al., 1967, a) und der Nitroreduktion (Gillette et al., 1968) abweicht. Gegen eine Beteiligung des Cytochrom P-450 spricht weiterhin die mangelnde Stimulierbarkeit der Metyraponreduktase durch Phenobarbitalvorbehandlung, was sich mit keiner der bisher beschriebenen Reduktasen vergleichen läßt. Metyrapon besitzt neben seiner Hemmwirkung auf die Steroidhydroxylierung - außer am C₁₁ auch in der Stellung C₁₈ (Kraulis und Birmingham, 1963; Erickson et al., 1966) und C₁₉ (Sanzari und Péron, 1966), nicht aber C₂₁ (Netter et al., 1967) - auch die mikrosomale Arzneimittelhydroxylierung in der Leber (Leibman, 1966; Netter et al., 1967). Dieser hemmende Effekt auf den oxydativen Arzneimittelstoffwechsel, verbunden mit einer spektralen Charakteristik, die dem kohlenmonoxidbedingten Absorptionsspektrum des Cytochrom P-450 eng benachbart ist (Hildebrandt et al., 1969), ließ an eine dem Kohlenmonoxid vergleichbare Wirkung des Metyrapon in den Mikrosomen denken. Die Sauerstoffaufnahme der Mikrosomen wird durch Metyrapon erst in Gegenwart eines hydroxylierbaren Substrates gesenkt (Kahl und Netter, 1970), was für eine Interaktion des Metyrapon auf der Ebene der Substrat-hydroxylierung spricht.

Auch außerhalb der Mikrosomen bewirkt Metyrapon eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme. In der mitochondrialen Atmungskette liegt der blockierende Einfluß des Metyrapon auf der Ebene der Flavoproteine (Kahl und Simon, 1971). Bei Messung des Lactat/Pyruvat-Quotienten und des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten im Perfusionsmedium der isoliert perfundierten Leber zeigt sich ein deutlicher Anstieg beider Quotienten - er resultiert aus einer Blockade des Wasserstofftransportsystems in den Mitochondrien (Kahl und Simon, 1971) durch Metyrapon in höherer Konzentration.

Das System der isoliert perfundierten Leber hat eine Mittelstellung zwischen der Methodik der *in vitro*- und der *in vivo*-Versuche. Die erste Leberperfusion wurde 1875 von Luchsinger durchgeführt. Hieraus entwickelte sich die Operationstechnik der frei präparierten Leber (Miller et al., 1951; Schimassek, 1963).

Wesentlich besser standardisierte Versuchsbedingungen wurden durch die Verwendung halbsynthetischen Blutes mit Rindererythrocyten ermöglicht (Schimassek, 1962; 1963). Trotz der erheblich eingeschränkten Gewährleistung ausreichender Sauerstoffversorgung der Leber brachte das hämoglobinfreie Perfusionsmedium weitere technische und methodische Vereinfachungen, welche die Reproduzierbarkeit der Versuche erhöhten (Scholz und Bücher, 1965; Scholz, 1968, a)

Gegenüber den Fraktionierungen des Leberhomogenates bringt dieses "semi *in vivo*"-System den Vorteil, die membrangebundenen Enzymkomplexe in ihrer Nativstruktur zu belassen und die mikrosomalen Reaktionen im komplexen Milieu der intakten Zelle zu prüfen. Dennoch müssen ständig die Kriterien der Leberfunktion kontrolliert werden. Zu ihnen rechnet Schimassek (1962) den Durchfluß bei druckkonstanter Perfusion, die Galleproduktion, den Sauerstoffverbrauch und den Lactat/Pyruvat-Quotienten als Parameter des Redoxzustandes der Pyridinnucleotide in der Leber. Hierzu entwickelte Scholz (1968, a) eine Methode der direkten Oberflächenfluorometrie zur Erfassung des Redoxzustandes der Pyridinnucleotide.

ZIEL DER ARBEIT

Die Untersuchungen gelten dem reduktiven Stoffwechsel von Neoprontosil an der isoliert perfundierten Rattenleber, der anhand der Ausscheidung von freiem Sulfanilamid in das rezirkulierende hämoglobinfreie Perfusionsmedium gemessen werden soll.

1. Als erstes soll geklärt werden, welche Rolle die Azospaltung in der isolierten Leber bei normaler Sauerstoffversorgung des überlebenden Organs spielt. Nachdem eine erhebliche Beschleunigung der Azospaltung durch anoxische Perfusionsbedingungen nachgewiesen ist, soll durch eine stufenweise Erniedrigung des Sauerstoffangebotes an das überlebende Organ ein Grenzwert ermittelt werden, ab dem die Azospaltung verstärkt in Gang kommt.
2. Eine weitere Versuchsserie gilt der Frage, ob sich eine Beschleunigung der Neoprontosilreduktion auch durch eine Überflutung der Zelle mit reduzierenden Äquivalenten erreichen läßt, die nicht durch einen Sauerstoffmangel entstehen. Hierzu werden Versuche mit Metyrapon durchgeführt, einer Substanz, durch die der Elektronenfluß in der mitochondrialen Atmungskette behindert werden kann. Ein orientierender Versuch mit Äthanol, der über einen anderen Mechanismus eine Erhöhung der NADH-Konzentration in der Leberzelle bewirkt, soll ebenfalls ausgeführt werden.
3. Unter hypoxischen Versuchsbedingungen soll der Einfluß von Kohlenmonoxid auf die Azospaltung untersucht werden. Im Anschluß an die Befunde anderer Untersuchungen *in vitro* (Lier, 1972) soll dabei geprüft werden, ob sich auch auf der Ebene des überlebenden Organs die durch Kohlenmonoxid gehemmte Neoprontosilspaltung durch Metyrapon reaktivieren läßt.
4. Der Frage der weiteren Verstoffwechslung von Sulfanilamid, eines der durch die Spaltung von Neoprontosil entstehenden Produkte, gelten Versuche, in denen der isolierten Leber Sulfanilamid als Substrat angeboten wird. Die beobachtete Verminderung der eingesetzten Sulfanilamidmenge führt zu der Frage, ob sich Konjugationsprozesse als der wahrscheinliche Eliminationsmechanismus für das Sulfanilamid nachweisen lassen.
5. Ein Vergleich der Elimination von Neoprontosil aus dem Perfusionsmedium mit der entstandenen Menge an freiem Sulfanilamid soll die Frage beantworten,

ob sich die direkte Messung des verschwindenden Neoprontosils zur kontinuierlichen Messung der Azospaltung eignet. Einige Versuche gelten schließlich der Frage, ob sich ein Induktionseffekt auf die Azoreduktion bei einer Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital bereits an einer Vermehrung der Menge an freiem Sulfanilamid ablesen läßt.

METHODEN

1. Tiermaterial

200 - 300g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten, denen Wasser ad libitum und Trockenfutter (Altromin^R) zur Verfügung standen, wurden durch intraperitoneale Injektion von 6ml/kg Körpergewicht einer 20%igen Urethanlösung (20g Urethan ad 100g aq. dest.) anästhesiert. 0,25ml/100g Körpergewicht einer 0,4%igen Heparinlösung (Vetren^R) wurden in die Schwanzvene injiziert.

2. Vorbehandlung der Tiere

Bei Verwendung phenobarbitalinduzierter Lebern erfolgte die Stimulierung durch intraperitoneale Injektion einer 1,6%igen Phenobarbital-Na-Lösung in einer Dosis von 80mg/kg Körpergewicht/Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Zeit zwischen letzter Injektion und Tötung der Tiere betrug 15-20 Stunden.

3. Präparation der isolierten Leber

Die Leberperfusion erfolgte in situ in Anlehnung an Hems et al. (1966). Nach Freilegen des Bauchsitus durch breite Laparotomie mit Längs- und Querschnitt und nach Abdrängen des Darmkonvolutes ließ sich das Pfortadergebiet darstellen. In den durch duodenumnahe Ligatur gestauten und infolgedessen erweiterten Gallengang wurde nach Inzision ein Katheter (PVC) eingeschoben, der mittels einer zuvor gelegten Schlinge am leberhilusnahen Teil durch Zuziehen und Knoten derselben fixiert wurde. Anschließend erfolgte lockeres Anschlingen der Arteria hepatica und Vena cava inferior in Höhe des Abgangs der Nierenvene. Einlegen und Fixieren des Pfortaderkatheters erfolgten in gleicher Weise wie beim Gallengang. Zur Vermeidung von Luftembolien wurde der Pfortaderkatheter mit Krebs-Ringer-B i karbonatlösung gefüllt. Nach Einbinden des Pfortaderkatheters wurden die restlichen Ligaturen zugezogen und geknotet. Von jetzt ab wurde die Zeit der Leberanoxie gerechnet. Nach Entfernung der vorderen Brustkorbbwand konnte der Vena-cava-Katheter nach Einschnitt in den rechten Vorhof in die Vena cava inferior vorgeschoben und durch Ligatur fixiert werden. Vor Anschluß an die Perfusionsapparatur wurde die Leber weitgehend frei von Eigenblut gespült, so daß sie eine blaßgelbe Farbe annahm. Mit dem Beginn dieser Spülung endete die Anoxiezeit, die im Mittel 3-4 Minuten betrug. Die Zeit vom Operationsbeginn bis zum Anschluß an die Perfusionsapparatur betrug durchschnittlich 10 Minuten.

4. Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium bestand aus 100ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung, die auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt wurde. Nach Zusatz von Rinderserumalbumin (2g/100ml) als kolloidosmotischem Anteil und 400mg/100ml Glucose betrug der pH-Wert etwa 7,5. Nach Begasung mit Gasgemischen mit einem CO_2 -Anteil von 5 Vol. % stellte sich der pH in der Regel auf 7,3 bis 7,4 ein.

5. Vorbereitung der Versuche

Die Perfusionsapparatur wurde nach jedem Versuch gründlich mit Natronlauge und destilliertem Wasser ausgewaschen. Vor jedem Versuch wurde nach nochmaliger Spülung mit destilliertem Wasser Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung in Umlauf gebracht. Die in einem Wasserbad bei 30°C temperierten Elektroden wurden vor jeder polarographischen Messung mit zwei Eichgasen (nachgereinigter Stickstoff und Luft) unter Berücksichtigung der täglichen Luftdruckschwankungen geeicht.

Die Intaktheitsprüfung der Elektroden erfolgte durch Aufnahme von Polarogrammen bei zwei verschiedenen Sauerstoffspannungen. Am Versuchsende fand eine Kontrolleichung statt.

Die Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung wurde vor Operationsbeginn gegen das Perfusionsmedium ausgetauscht.

6. Perfusionstechnik

Das rezirkulierende Medium wurde mit Hilfe eines Plattenoxygenators der Firma Eschweiler mit den betreffenden Gasgemischen aufgesättigt und passierte volumenkonstant bei einer Temperatur von 30°C mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30ml/Minute, die durch eine Rollenpumpe reguliert war, die Leber. Die arteriellen und venösen Sauerstoffdrucke konnten im Nebenschluß kontinuierlich mit Hilfe von Platinelektroden der polarographischen Meßeinrichtung der Firma Eschweiler Kiel gemessen werden. Der mechanische Druck im arteriellen und venösen Schenkel wurde kontinuierlich registriert, um Fehlmessungen der druckempfindlichen Clark'schen Sauerstoffelektroden auszuschließen, sowie um die Druckverhältnisse während der Perfusion reproduzierbar einzustellen. Zur Durchmischung des arteriellen mit dem venösen Medium wurde der Depotgefäßinhalt mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten.

7. Herstellung der Gasgemische

Die Gasgemische wurden mit einer Gasuhr in einem Plastiksack ohne Wandspannung hergestellt aus einem Gasgemisch I, bestehend aus 95 Vol.% Stickstoff und 5 Vol.% Kohlendioxid, sowie einem Gasgemisch II, bestehend aus 95 Vol.% Sauerstoff und 5 Vol.% Kohlendioxid. Das genaue Mischungsverhältnis wurde durch polarographische Messung des Sauerstoffpartialdruckes bestimmt, der sich nach Begasung des Perfusionsmediums einstellte.

8. Genereller Versuchsablauf

Die hämoglobinfrei gespülte Leber wurde an den Kreislauf der Perfusionsapparatur so angeschlossen, daß das rezirkulierende Medium durch die Pfortader in die Leber eintrat und sie über den Ausflußkatheter in der unteren Hohlvene verließ. Sofort nach Anschluß der Leber stellte sich der venöse Sauerstoffdruck bei gleichbleibendem arteriellen Sauerstoffdruck auf einen etwa 500 Torr unter dem arteriellen Druck liegenden Wert ein.

8-12 Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte die Substratzugabe (Neoprontosil $10^{-4}M$). Zuvor wurden 2,5 ml Perfusionsmedium aus dem Abflußkatheter entnommen; diese Probe wurde zum Leerwert für die Substrat- bzw. Metabolitbestimmung aufbereitet. Alle weiteren Probenentnahmen erfolgten aus dem Vena-cava-Katheter in fünfminütigen Intervallen. Die Intaktheit der Leberfunktion wurde anhand der Gallesekretion und der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz überprüft. Die Leberperfusionszeit betrug 60-120 Minuten. Am Ende der Perfusion wurde das Volumen des restlichen Perfusates, das Gallievolumen sowie das Lebergewicht ermittelt.

9. Durchführung der Einzelversuche

9.1. Um die Abhängigkeit der Neoprontosilreduktion vom Sauerstoffpartialdruck zu untersuchen, folgte auf eine Vorperfusion von 35 Minuten, während der die Lebern durch Begasung des Perfusionsmediums mit einem Gasgemisch, das sich aus 95 Vol.% Sauerstoff und 5 Vol.% Kohlendioxid zusammensetzte, ausreichend mit Sauerstoff versorgt waren, eine Perfusionsperiode, in der durch Reduktion des Sauerstoffanteils im Gasgemisch jeweils ein bestimmter niedriger arterieller Sauerstoffpartialdruck eingestellt wurde.

9.2. In einer zweiten Versuchsserie wurde der Einfluß von Metyrapon auf die Neoprontosilreduktion untersucht. Dabei wurde dem Perfusionsmedium Neoprontosil in

einer Konzentration von 10^{-4} M zugesetzt. Nach 15 Minuten erfolgte die Zugabe von Metyrapon (10^{-3} M im Perfusionsmedium) beziehungsweise von gleichen Volumina Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung in entsprechenden Kontrollversuchen. Durch Begasung mit einem Kohlendioxid-Stickstoff-Gemisch (5 Vol. % Kohlendioxid in Stickstoff) wurde nach 35 Minuten Anoxie hergestellt. Nach weiteren 35 Minuten erfolgte die Zugabe von Neoprontosil (10^{-4} M) unter Beibehaltung der Anoxie beziehungsweise unter Begasung des Mediums mit Kohlenmonoxid. Der Einfluß von Metyrapon auf die kohlenmonoxidbedingte Veränderung der Neoprontosilreduktion wurde durch Zugabe von Metyrapon nach 30-minütiger Kohlenmonoxidbegasung des Mediums untersucht.

10. Kontrollversuche

10.1. Ein erster Kontrollversuch beinhaltet den Ausschluß einer nichthepatisch bedingten Neoprontosilreduktion zum Beispiel durch Bakterien. Hierzu wurde nach 45-minütiger Perfusion des Mediums durch die Rattenleber das Perfusionssystem nach Entfernung des Organs in sich kurzgeschlossen. In dieser leberfreien Scheinperfusion wurde die nach Zugabe von Neoprontosil (10^{-4} M) erreichte Anfangskonzentration bestimmt. Nach 35 Minuten wurde auf Anoxie umgeschaltet. Die Neoprontosilkonzentration im Medium wurde über weitere 45 Minuten verfolgt. Eine gemessene Neoprontosilkonzentration von 100 nMol/ml blieb über 70 Minuten unverändert.

10.2. Um eine Metabolisierung von Sulfanilamid zu erfassen, wurde in einigen Versuchen statt Neoprontosil Sulfanilamid (10^{-5} M) in das Perfusionsmedium gegeben. Die Sulfanilamidkonzentration wurde über eine Perfusionszeit von 35 Minuten unter ausreichender Sauerstoffversorgung der Leber und über weitere 35 Minuten unter Anoxie verfolgt.

Dem Ausschluß eines störenden Einflusses von Kohlenmonoxid auf die Sulfanilamid-erfassung diente die zusätzliche Begasung mit Kohlenmonoxid nach 35 Minuten der Anoxie.

11. Quantitative Bestimmung von Neoprontosil und Sulfanilamid

Unmittelbar nach Entnahme wurden die Proben (2,5 ml) zur Enteiweißung mit 15%iger Trichloressigsäure zu gleichen Teilen versetzt. Zur Sedimentation des Eiweißes erwies sich das Zentrifugieren mit 3200 UpM für 10 Minuten in einer Christ-Tisch-

zentrifuge (Universal Junior I) als ausreichend. Der Überstand wurde zur Erfassung der Neoprontosilkonzentration am Photometer "Eppendorf" in Glasküvetten von 1 cm Lichtweg bei der Wellenlänge 546 nm photometriert. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes für die Messung bei dieser Wellenlänge wurde für den verwendeten Konzentrationsbereich von Neoprontosil gesichert. Das neben einem Naphthylkörper bei der Spaltung der Azobrücke des Neoprontosils entstehende Sulfanilamid bestimmten wir nach der von Bratton und Marshall (1939) angegebenen Diazotierungsmethode. Das sich ergebende Diazotierungsprodukt hat sein Absorptionsmaximum bei 545 nm. Bei der gewählten Meßwellenlänge von 578 nm ist die Sulfanilamidkonzentration noch gut erfaßbar, während der interferierende Einfluß von Neoprontosil sehr gering ist. Er wurde durch Umrechnung der Absorption bei 578 nm von nicht-diazotierten Proben berücksichtigt. Zur Kontrolle dieses geringgradigen neoprontosilbedingten Absorptionsanteiles bei 578 nm wurden außerdem Eichkurven angelegt, die darstellten, daß sich kleine Sulfanilamidmengen in Gegenwart hoher Neoprontosilmengen vollständig erfassen lassen.

Zur Diazotierung von Sulfanilamid wurde zu 2,5 ml Überstand 0,5 ml 0,1%ige Natriumnitritlösung gegeben. Nach Mischen und dreiminütiger Inkubation im Eisbad wurden 0,5 ml 0,5%ige Ammoniumsulfamatlösung ($\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$) hinzugesetzt. Um das entstandene Diazoniumsalz photometrisch bestimmen zu können, wurde nach drei Minuten Einwirkungszeit von Ammoniumsulfamat 0,5 ml 0,1%ige N-(1-naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochloridlösung hinzugefügt, welche eine Kupplung mit dem Diazoniumsalz eingeht und dieses violett färbt.

Zur Erfassung des gesamten Sulfanilamids (freies plus konjugiertes) wurde in Anlehnung an die Methode von Bratton und Marshall (1939) die Hydrolyse vor der Diazotierung in folgender Weise durchgeführt: 2,5 ml Überstand wurden nach Zugabe von 0,125 ml 4N HCl in mit Glasstopfen verschlossenen Schüttelbirnen für eine Stunde im Wasserbad gekocht.

Ein möglicherweise störender Einfluß von Metyrapon (10^{-3}M) auf die Diazotierungsreaktion von Sulfanilamid wurde ausgeschlossen, indem die Sulfanilamidbestimmung in Anwesenheit von Metyrapon durchgeführt wurde.

Zur Berechnung der Konzentration der Substanzen aus der ermittelten Absorption bei 546 nm für Neoprontosil und 578 nm für Sulfanilamid lagen die Eichkurven beider Substanzen zu Grunde. Das Verdünnungsmedium der Eichkurven konnte unberücksichtigt bleiben, da sich in entsprechenden Eichkurven aus verschiedenen Verdünnungsmedien (aq. bidest / Trichloressigsäure; Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung / Trichloressigsäure; Perfusionsmedium ohne Rattenleberpassage in Trichloressigsäure; Perfusionsmedium nach zehnminütiger Rattenleberpassage in Trichloressigsäure) kein Einfluß auf die Neoprontosilabsorption beziehungsweise diejenige des Azofarbstoffes von Sulfanilamid zeigte.

Aus den Eichkurven wurden Regressionsgeraden gewonnen, mit deren Hilfe die Substrat- bzw. Metabolitkonzentration pro ml Perfusat pro g Leber Feuchtgewicht berechnet wurde.

12. Atmungsgröße des isolierten Organs

Die Atmungsgröße des isolierten Organs wurde aus dem Durchflußvolumen der Leber und der arteriovenösen Differenz des Sauerstoffpartialdruckes des Perfusionsmediums berechnet. Für die Umrechnung in $\mu\text{Atom/g Leber Feuchtgewicht}$ wurde ein Bunsenscher Absorptionskoeffizient von 0,026 zu Grunde gelegt.

13. Substanzen

Neoprontosil als Dinatriumsalz der 2-(4-Sulfonamidophenylazo)-acetylaminol-1-hydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure von Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer, N.Y.;

Sulfanilamid als p-Aminobenzolsulfonamid von Schuchard, München;

Metyrapon als Metopiron^R von Ciba Pharmaceutical Company, Summit, N.J., U.S.A.;

Natriumnitrit von Merck, Darmstadt;

N-1-Naphthyl-aethylendiamin-dihydrochlorid von Schuchard, München;

Trichloressigsäure von Merck, Darmstadt;

Vetren^R, Heparin-Natrium USP XVII, 125 000 IE (ca. 1g) von Promonta, Hamburg;

Urethan von Merck, Darmstadt;

Ammoniumsulfamat von Merck, Darmstadt;

Rinderserumalbumin, trocken, reinst, von Behringwerke AG, Marburg/Lahn

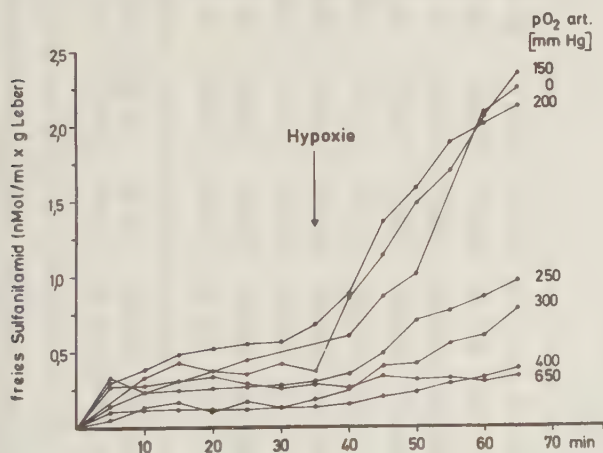
Phenobarbital als Natrium-Phenyläthylbarbitursäure von Merck, Darmstadt.

ERGEBNISSE

1. Abhängigkeit der Neoprontosilreduktion vom Sauerstoffgehalt des Perfusionsmediums

Abb. 1 stellt den Einfluß einer unterschiedlichen Sauerstoffversorgung der Leber auf die Bildung von freiem Sulfanilamid dar. Die Einzelversuche zeigen nur eine geringe Sulfanilamidbildung in der Versuchsperiode bis 35 Minuten, in der die Lebern unter optimaler Sauerstoffversorgung bei einer durchschnittlichen arterio-venösen Sauerstoffdifferenz von etwa 500 Torr und einem venösen Druck über 150 Torr perfundiert wurden.

Abb. 1: Entstehung von freiem Sulfanilamid in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung der isolierten Rattenleber



Nach einer Vorperfusionszeit von 35 Minuten mit einer Neoprontosilkonzentration von 0,1 mM unter optimaler Sauerstoffversorgung der Leber wurde das Perfusionsmedium in den folgenden 30 Minuten mit definierten Gasgemischen äquilibriert, die den angegebenen arteriellen Sauerstoffpartialdruck einstellen.

Tab. 1 gibt die Sauerstoffaufnahme verschiedener Lebern in der Vorperiode unter optimalem Sauerstoffangebot wieder.

Tabelle 1: Sauerstoffaufnahme isolierter Rattenlebern bei optimalem Sauerstoffangebot in $\mu\text{Atom pro g Leber Feuchtgewicht pro Stunde}$

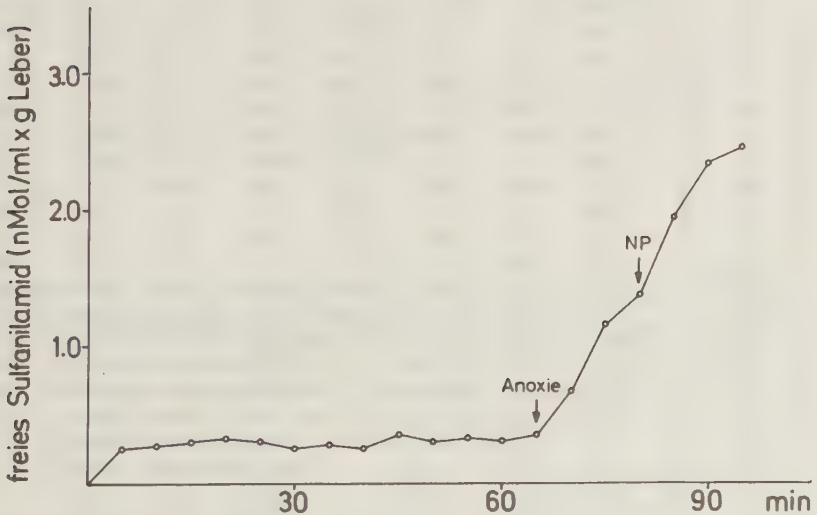
Perfusionszeitpunkt (Min. nach 0, 1 M Neoprontosilzugabe)	0	5	10	15	20	25	30	35
Versuch 1	436,36	410,18	366,54	357,81	331,63	331,63	349,09	375,27
2	341,96	331,90	301,73	288,31	288,31	288,31	308,43	315,14
3	302,40	283,15	252,91	239,17	241,92	249,42	261,16	266,66
4	251,51	222,26	204,77	187,17	181,32	175,47	169,62	169,62
5	277,04	217,37	217,37	217,37	217,37	217,37	217,37	217,37
6	298,93	298,93	261,56	250,89	250,89	250,49	288,25	304,26
7	328,62	328,62	378,06	221,50	214,86	214,86	214,86	221,18
8	307,89	302,40	269,41	230,92	230,92	236,42	237,42	258,41
9	274,90	274,90	274,90	280,40	280,40	291,40	291,40	291,40
$\bar{X}$	313,29	296,63	280,81	252,62	248,62	250,60	259,73	268,81
$\pm s$	+17,94	+19,60	+19,85	+16,77	+15,13	+15,75	+18,48	+20,45
$\bar{X}$								

Die Werte stellen das arithmetische Mittel ($\bar{X}$) und den mittleren Fehler des Mittelwertes (s) dar.

Nach Umschaltung auf Gasgemische mit niedrigerem Sauerstoffgehalt steigt die Sulfanilamidbildung mit der Verschlechterung der Sauerstoffversorgung an, bis sie bei einem "arteriellen" Sauerstoffpartialdruck von 200 Torr das Ausmaß wie bei maximaler Hypoxie erreicht.

Ob die durch Hypoxie zum Zeitpunkt 35 Minuten auslösbare Neoprontosilspaltung auch noch zu einem späteren Perfusionszeitpunkt erfolgen kann, wird durch den Einzelversuch in Abb.2 dargestellt. In diesem Experiment wurde die Sulfanilamidbildung über 65 Minuten unter guter Sauerstoffversorgung der Leber verfolgt. Dabei steigt die geringgradige Neoprontosilreduktion unter Sauerstoff in dem beobachteten Zeitraum von 65 Minuten nicht an. Die Zunahme des freien Sulfanilamids nach Anoxie unterscheidet sich nicht von Ergebnissen bei ähnlicher Versuchsanordnung mit kürzerer Perfusionsdauer.

Abb.2:Einfluß der Perfusionsdauer auf die Neoprontosilreduktion



Der Versuch zeigt die Konzentration an freiem Sulfanilamid über eine Perfusionszeit von 65 Minuten. Nach einer Perfusionsdauer von 65 Minuten mit Neoprontosil (0, 1mM) unter optimaler Sauerstoffversorgung wird das Perfusionsmedium mit einem anoxischen Gasgemisch (5% Kohlendioxid in Stickstoff) äquiliбриert. Nach 80 Minuten erfolgt

erneute Neoprontosilzugabe. Gemessen ist die Konzentration an freiem Sulfanilamid im Medium.

2. Reduktion von Neoprontosil in Gegenwart von Metyrapon und Äthanol

Vier Versuche und drei Kontrollversuche galten der Frage, ob Metyrapon die Bildung von freiem Sulfanilamid beeinflusst.

Tab. 2 gibt eine Übersicht über die Konzentrationen von Neoprontosil und Sulfanilamid im Perfusionsmedium zu den einzelnen Perfusionszeitpunkten mit und ohne Metyrapon sowohl unter guter Sauerstoffversorgung als auch unter hypoxischen Bedingungen.

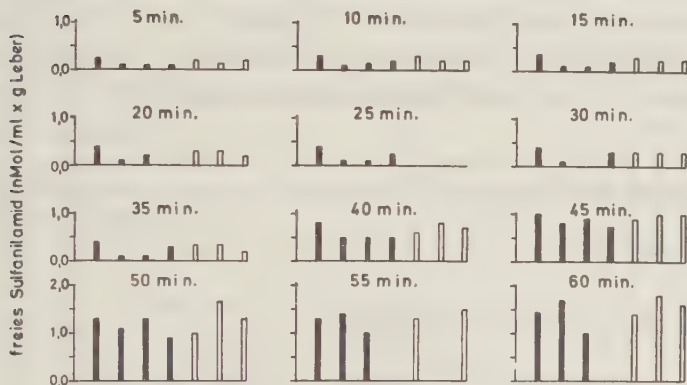
Tab. 2: Einfluß von Metyrapon und Sauerstoff auf die Neoprontosil- und Sulfanilamidkonzentration in nMol pro ml Perfusionsmedium pro g Leber Feuchtgewicht

Versuch	Neoprontosilkonzentration (nMol/ml x g Leber)				Sulfanilamidkonzentration (nMol/ml x g Leber)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5	10,07	----	8,14	6,20	0,27	0,09	0,11	0,06
10	10,68	6,11	8,45	6,07	0,30	0,14	0,15	0,17
15	11,49	6,11	8,30	5,94	0,35	0,13	0,14	0,20
20	11,29	5,54	7,83	5,68	0,45	0,10	0,19	----
25	11,29	5,54	7,83	5,68	0,45	0,12	0,11	0,25
30	11,09	5,09	7,83	5,68	0,43	0,13	----	0,30
35	9,95	4,86	7,68	5,32	0,44	0,14	0,13	0,33
40	9,66	4,40	7,06	5,16	0,82	0,52	0,54	0,53
45	9,17	4,38	7,00	4,56	1,07	0,83	0,97	0,75
50	9,46	4,29	6,13	4,53	1,31	1,11	1,31	0,88
55	9,25	3,72	5,81	4,14	1,60	1,33	1,42	0,99
60	9,05	3,08	5,66	4,11	1,56	1,45	1,70	1,03
65	8,64	2,86	5,04	3,82	1,62	1,62	2,00	1,11
70	8,40	2,49	4,88	3,72	1,63	1,74	----	1,20
5	8,62	7,13	6,32		0,23	0,14	0,20	
10	8,78	6,71	6,44		0,29	0,23	0,21	
15	8,62	----	6,20		0,28	0,25	0,25	
20	9,43	6,02	5,84		0,29	0,29	0,24	
25	----	6,02	----		----	----	----	
30	9,27	5,89	5,36		0,34	0,39	0,30	
35	9,27	5,44	5,24		0,37	0,35	0,21	
40	8,33	4,84	4,64		0,66	0,83	0,74	
45	7,98	4,37	4,03		0,94	1,19	1,12	
50	7,49	4,09	3,43		1,12	1,71	1,36	
55	7,01	3,54	3,55		1,29	----	1,53	
60	6,53	3,26	2,83		1,45	1,82	1,61	
65	6,17	3,13	2,27		1,58	1,99	1,64	
70	6,21	2,66	1,98		1,67	2,08	1,61	

Die Versuchsbedingungen sind in der Legende der Abb. 3 angegeben.

In den Strichdiagrammen der Abb.3 sind die Konzentrationen an freiem Sulfanilamid zu den einzelnen Perfusionszeitpunkten für die Metyrapon- und Kontrollversuche graphisch gegenüber gestellt. Aus dieser Veranschaulichung ergibt sich, daß Metyrapon zu keinem Perfusionszeitpunkt einen wesentlichen Einfluß auf die Reduktionsgeschwindigkeit des Neoprontosils ausübt.

Abb.3: Entstehung von freiem Sulfanilamid in Gegenwart von Metyrapon

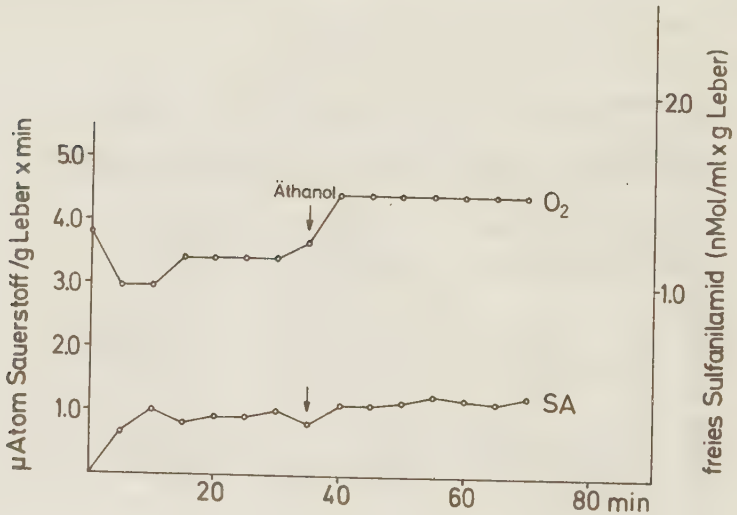


15 Minuten nach Zugabe von Neoprontasil (0,1 mM) zum Perfusat wurde Metyrapon (1 mM) eingebracht. In den Kontrollversuchen wurde ein gleiches Volumen (1,5 ml) Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung zugegeben. Nach 35 Minuten wurde das Perfusionsmedium mit einem anoxischen Gasgemisch (5% Kohlendioxid in Stickstoff) äquilibriert. In den Strichdiagrammen werden die Konzentrationen an freiem Sulfanilamid über eine Perfusionsdauer von 60 Minuten in fünfminütigen Abständen verglichen. Die ausgezogenen Säulen stellen die Metyraponversuche - die offenen Säulen die Kontrollversuche dar.

In dem Einzelexperiment der Abb.4 wird geprüft, ob Äthylalkohol in hohen Konzentrationen zu einer verstärkten Bildung von Sulfanilamid führt. Innerhalb einer Beobachtungsperiode von 35 Minuten unter 38 mM Äthanol läßt sich unter optimalem Sauerstoffangebot kein

Anstieg der Neoprontosilreduktion erkennen, während der Sauerstoffverbrauch sofort nach Alkoholzugabe um etwa $1 \mu\text{Atom/g Leber} \times \text{Minute}$ zunimmt.

Abb.4:Einfluß von Äthanol (38 mM) auf den Sauerstoffverbrauch und die Neoprontosilreduktion an der isoliert perfundierten Leber



Nach einer Vorperfusionsperiode von 35 Minuten mit einer Neoprontosil-Anfangskonzentration (0,1 mM) wurde dem Perfusionsmedium Äthanol (38 mM) zugefügt. Dargestellt wird die freie Sulfanilamidkonzentration bzw. die Sauerstoffaufnahme, die aus der arterio-venösen Differenz des Sauerstoffgehaltes und der Perfusionsgeschwindigkeit errechnet und auf das Lebergewicht am Ende der Perfusion bezogen wurde.

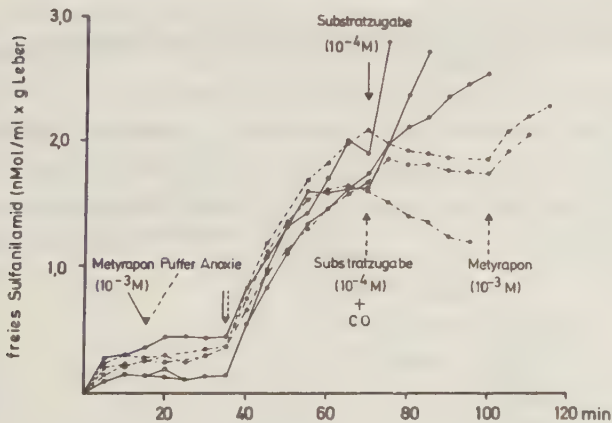
3. Hemmung der Neoprontosilreduktion durch Kohlenmonoxid und ihre Reaktivierung durch Metyrapon

In den Versuchen der Abb.5 wurde nach einer Vorperiode unter Sauerstoff nach 35 Minuten auf anoxische Perfusionsbedingungen umgeschaltet. Danach zeigt sich ein steiler Anstieg der Bildung von freiem Sulfanilamid. Zum Zeitpunkt 70 Minuten wurde erneut Substrat zugegeben und gleichzeitig mit der Kohlenmonoxidbegasung des Mediums begonnen. Während in den Kontrollversuchen ohne Kohlenmonoxidbegasung nach der zweiten Substratzugabe eine weitere Bildung von freiem Sulfanilamid stattfindet, nimmt die

Sulfanilamidkonzentration in den kohlenmonoxidbegasten Versuchen eher ab. Diese Abnahme des freien Sulfanilamids im Medium könnte mit der Bildung von Sulfanilamidkonjugaten zusammenhängen, wie in der Deutung zu Abb.6 ausgeführt wird. Durch Zugabe von Metyrapon in den kohlenmonoxidgehemmten Versuchen zum Zeitpunkt 100 Minuten wird in zwei Experimenten eine Reaktivierung der Neoprontosilspaltung bewirkt.

Die Hemmung der Sulfanilamidbildung durch Kohlenmonoxid kann nicht auf Sauerstoff im Gasgemisch zurückgeführt werden, da der bei Begasung mit Kohlenmonoxid noch vorhandene Sauerstoffdruck im zuführenden Schenkel mit 20-30 Torr unter dem Sauerstoffdruck liegt, ab dem eine Hemmung der Neoprontosilspaltung durch Sauerstoff stattfindet (vgl. Abb.1). Die ausbleibende Veränderung der Sulfanilamidbildung durch Zugabe von Metyrapon in der Vorperiode unter Sauerstoff steht in Einklang mit den Ergebnissen von Tab.2.

Abb.5: Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf die Neoprontosilreduktion in der isolierten Rattenleber



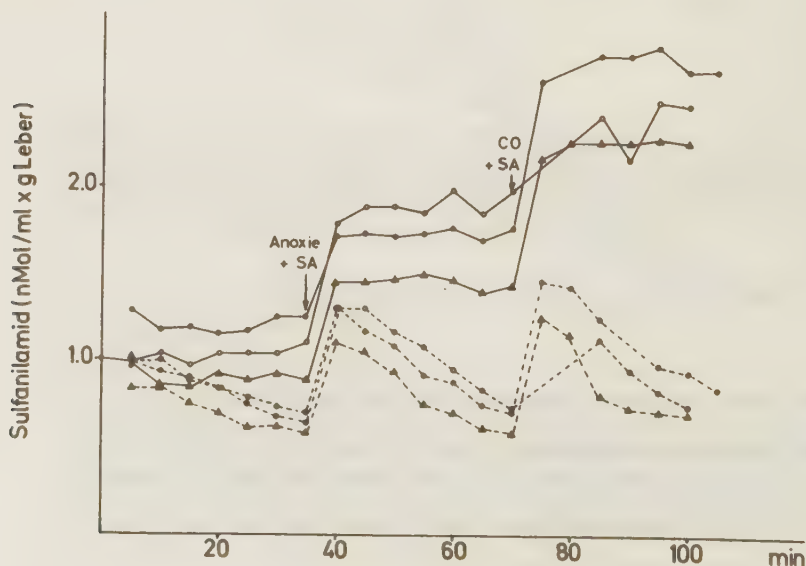
Nach 15 Minuten Vorperfusion mit einer Neoprontosil-Anfangskonzentration von 0,1 mM erfolgte die Zugabe von Metyrapon (1 mM) bzw. von Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung. Nach 35 Minuten Perfusionsdauer wurde das Medium mit einem anoxischen Gasgemisch (5% Kohlendioxid in Stickstoff) begast. 70 Minuten nach Versuchsbeginn wurde in den Perfusionen mit Metyrapon erneut Neoprontosil (0,1 mM) zugegeben. In den bis dahin metyraponfreien Versuchen wurde zu diesem Zeitpunkt außer Substrat

gleichzeitig Kohlenmonoxid zugeführt; die Metyraponzugabe (1 mM) erfolgte hier zum Zeitpunkt 100 Minuten. Angegeben sind die Konzentrationen an freiem Sulfanilamid.

4. Metabolisierung von Sulfanilamid

Um zu prüfen, ob das entstandene Sulfanilamid Endprodukt im Arzneimittelstoffwechsel der Leber ist, wurde in den Versuchen der Abb. 6 statt Neoprontosil Sulfanilamid als Substrat eingesetzt. Es zeigt sich eine Abnahme der freien Sulfanilamidkonzentration über die Zeit, die auf eine Metabolisierung von Sulfanilamid zurückgehen dürfte. Auch unter anoxischen Perfusionsbedingungen ist eine Verminderung des freien Sulfanilamids zu erkennen. Im dritten Abschnitt der Kurve wird die Verstoffwechslung von Sulfanilamid nach nochmaliger Zugabe unter Äquilibration des Mediums mit Kohlenmonoxid verfolgt. Ebenfalls wird eine Abnahme des freien Sulfanilamids deutlich. In allen drei Abschnitten wurde die Sulfanilamidkonzentration durch saure Hydrolyse der Proben auf einen Wert erhöht, der über die Perfusionszeit konstant blieb. Die in den Kurven sichtbaren Anstiege der Sulfanilamidkonzentrationen ergeben sich durch die Substratzugabe zu den Zeitpunkten 35 Minuten (Umschaltung auf Anoxie) sowie 75 Minuten (Umschaltung auf Kohlenmonoxid).

Abb. 6 Metabolisierung von Sulfanilamid an der isoliert perfundierten Rattenleber



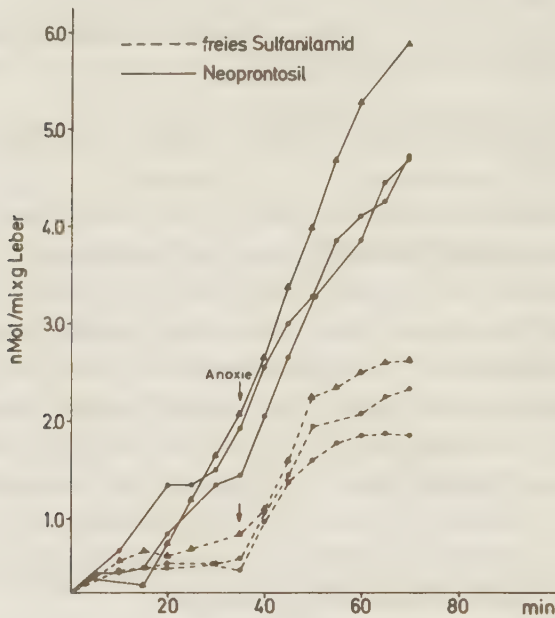
Nach einer Vorperfusion von 35 Minuten mit Sulfanilamid (10^{-5} M) erfolgt Anoxie und erneute Sulfanilamidzugabe. Nach weiteren 35 Minuten wird das Medium mit Kohlenmonoxid begast und erneut Sulfanilamid hinzugefügt. Dargestellt sind die Sulfanilamidkonzentrationen zu verschiedenen Perfusionszeitpunkten. Die gestrichelten Symbole geben das freie Sulfanilamid, die durchgezogenen Linien das gesamte Sulfanilamid (nach Hydrolyse) wieder.

5. Vergleich der Veränderung der Neoprontosilkonzentration im Perfusionsmedium mit der Sulfanilamidbildung

Abb.7 stellt die Abnahme der Neoprontosilkonzentration im Medium der Bildung von freiem Sulfanilamid gegenüber. Während die Neoprontosilabnahme sofort nach Substratzugabe in Form eines steilen Anstiegs der Kurve erkennbar ist, findet sich unter optimaler Sauerstoffversorgung nur eine verhältnismäßig geringe Sulfanilamidbildung, die der verschwundenen Neoprontosilmenge nicht entspricht. Man sieht, wie bei der Messung der Neoprontosilabnahme trotz Einführung maximaler Hypoxie nach 35 Minuten keine deutliche Veränderung in der Geschwindigkeit der Neoprontosilreduktion im Vergleich zur Vorstrecke nachweisbar ist, während die Sulfanilamidbildung eine Steigerung um den Faktor 8-10 erkennen läßt. Die Unterschiede zwischen beiden Messungen zeigen, daß sich die Veränderung der Sulfanilamidkonzentration nicht durch Messung der Neoprontosilkonzentration erfassen läßt.

Ein Vergleich der berechneten initialen Substratkonzentrationen mit den nach fünfminütiger Perfusion gemessenen Neoprontosilwerten ergibt, daß etwa 70% der berechneten Konzentration nach fünf Minuten im Medium vorhanden ist. Die Differenz zwischen diesen Werten dürfte durch Verteilungsvorgänge sowie durch Ausscheidung in die Galle entstehen.

Abb.7: Vergleichende Messung der Konzentration von Neoprontosil und freiem Sulfanilamid an der isoliert perfundierten Rattenleber

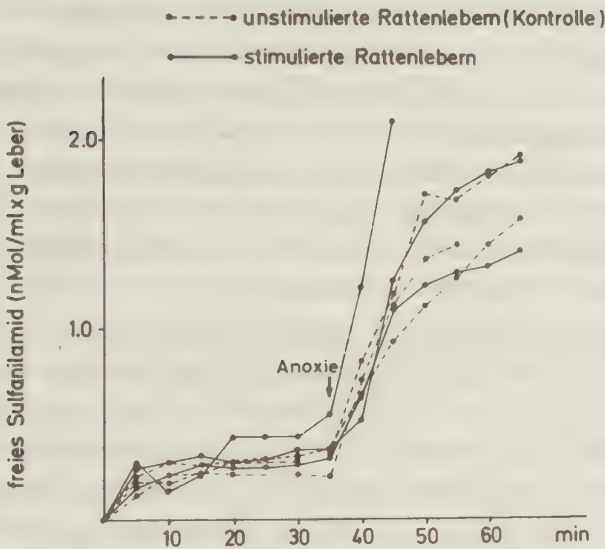


Nach einer Vorperfusion von 35 Minuten mit Neoprontosil (0,1 mM) unter ausreichender Sauerstoffversorgung wird das Perfusionsmedium mit einem anoxischen Gasmisch (5% Kohlendioxid in Stickstoff) äquilibriert. Die gestrichelten Symbole beziehen sich auf die freie Sulfanilamidkonzentration. Die durchgezogenen Linien geben die Differenz der Neoprontosil-Anfangskonzentration zu den aktuellen Neoprontosilkonzentrationen wieder.

6. Einfluß einer Vorbehandlung mit Phenobarbital auf die Konzentration von freiem Sulfanilamid im Medium

Abb. 8 stellt die Neoprontosilreduktion an Kontrollebern derjenigen von Lebern gegenüber, die von Ratten nach einer dreitägigen Vorbehandlung mit Phenobarbital stammten. Hinsichtlich der Menge an freiem Sulfanilamid läßt sich kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen erkennen.

Abb. 8: Einfluß der Phenobarbitalvorbehandlung auf die Konzentration an freiem Sulfanilamid



Nach einer Vorperfusion von 35 Minuten mit Neoprontosil (0,1 mM) unter ausreichender Sauerstoffversorgung wird das Perfusionsmedium mit einem anoxischen Gasgemisch äquilibriumiert. Die durchgezogenen Linien zeigen die Konzentration an freiem Sulfanilamid an der isolierten Rattenleber nach Stimulierung der Ratten mit 80 mg/kg Phenobarbital an drei Tagen. Die gestrichelten Linien zeigen die entsprechenden Werte nach Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung.

DISKUSSION

1. Sauerstoffempfindlichkeit des reduktiven Stoffwechsels von Neoprontosil

Die reduktive Spaltung von Neoprontosil in der isolierten Leber wird durch Sauerstoff stark gehemmt. In unseren Versuchen zeigte sich unter Sauerstoff im Vergleich zu hypoxischen Perfusionsbedingungen eine nur langsame Entstehung von freiem Sulfanilamid. Es stellt sich jedoch die Frage, ob das gemessene freie Sulfanilamid unter diesen Bedingungen nur einen kleinen Teil der reduktiven Neoprontosilspaltung repräsentiert und der Hauptteil des anfallenden Sulfanilamids durch einen konjugierenden Stoffwechsel weiter metabolisiert wird. Von den möglichen Stoffwechselwegen des Sulfanilamids - Acetylierung und Oxydation, zu einem geringen Prozentsatz die Kopplung mit Glucuronsäure, Sulfat und Sulfamat (Thompson, 1969) - gilt die N⁴-Acetylierung als die bedeutendste Abbaureaktion. Schon 1937 wiesen Marshall et al. bzw. Fuller die Acetylierung von Sulfanilamid im Menschen und beim Kaninchen nach. 1938 konnten Klein und Harris den Hauptsitz dieser Reaktion in die Leber lokalisieren. Govier (1965) fand als bevorzugten Ort der Acetylierung in der Leber die Zellen des retikuloendothelialen Systems.

Wir haben das Ausmaß eines konjugierenden Stoffwechsels von Sulfanilamid an der isolierten Leber für unsere experimentellen Bedingungen bei Einsatz relativ hoher Sulfanilamidkonzentrationen (Abb. 6) überprüft. Es zeigte sich eine Abnahme der Menge an freiem Sulfanilamid, die eine Tendenz zur Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration erkennen läßt und auf eine Kopplungsreaktion zurückgeführt werden muß. Es ist bemerkenswert, daß die Kopplungsreaktion weder durch maximale Hypoxie noch durch Begasung des Mediums mit Kohlenmonoxid gehemmt wird. In den Perfusionen, in denen sich unter Sauerstoff keine wesentliche Veränderung der Sulfanilamidkonzentration im Medium zeigt (Abb. 1, Tab. 2, Abb. 4, Abb. 5, Abb. 7, Abb. 8), dürfte die Entstehung von freiem Sulfanilamid mit der Abnahme durch Konjugation im Gleichgewicht stehen. Aus Abb. 6 läßt sich abschätzen, daß die Gesamtmenge an entstandenem Sulfanilamid maximal den doppelten Betrag der freien Sulfanilamidmenge ausmachen dürfte, zumal die Tendenz zur Abhängigkeit der Sulfanilamidkonjugation von der Substratkonzentration

für die niedrigeren Sulfanilamidkonzentrationen unter Sauerstoff eher eine geringere Konjugationsrate erwarten läßt.

Die enzymatische Reduktion von Prontosil und Neoprontosil wird auch in vitro durch Sauerstoff gehemmt (Fouts et al., 1957); für Mikrosomen findet sich eine vollständige Hemmung (Hernandez et al., 1967, a), während die Prontosilspaltung im Gesamtleberhomogenat durch Sauerstoff um 30%, die von Azobenzol um 50% gehemmt wird (Fouts et al., 1957). Der Angriffspunkt für diese Hemmung sind nach Hernandez et al. (1967, a) die Hydrazoverbindungen, die als Zwischenprodukte bei der Azoreduktion entstehen (Fouts et al., 1957). Entsprechende Untersuchungen liegen bei der Nitroreduktase vor: so wird die Reduktion von p-Hydroxylaminobenzoat in Lebermikrosomen durch Sauerstoff um 80% - im löslichen Überstand nur um 45% gehemmt (Kato et al., 1969).

Sowohl diese Befunde in vitro wie auch unsere Befunde an der isolierten Leber lassen erwarten, daß die hepatische Azospaltung in vivo eine allenfalls untergeordnete Rolle spielt. Vor einer Interpretation unserer Befunde für in vivo-Verhältnisse müßte allerdings bekannt sein, wie hoch die Sauerstoffsättigung des Gewebes bei maximalem Sauerstoffpartialdruck des "arteriellen" Perfusates ist. Durch Ermittlung des Sauerstoffpartialdruckes an der Leberoberfläche mit einer Platin-Mehrdrahtelektrode fanden Kessler und Schubotz (1968) einen über einen breiten Bereich unterschiedlichen Sauerstoffdruck im Gewebe (ca. 75 - 575 mm Hg). Bei hohen Sauerstoffpartialdrucken im zugeführten Medium (650 - 680 mm Hg) fließt nach Angaben dieser Autoren bis zu 45% des Sauerstoffs durch Kurzschlußdiffusion ab. Durch diesen Sauerstoffdiffusionshunt könnten hohe Sauerstoffpartialdrucke vorgetäuscht werden, wodurch die Bedeutung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz als Parameter für die Sauerstoffversorgung der Leber abgeschwächt werde. Wird auf die Sauerstoffspeicherfunktion des Hämoglobins, die eine optimale Sauerstoffversorgung gewährleistet, bei bestimmten Fragestellungen (z.B. Oberflächenfluoreszenzmessungen) aber die Messungen beeinträchtigt bzw. unmöglich macht, verzichtet und mit einem hämoglobinfreien Medium perfundiert, so sollte die Leber unterkühlt werden, die Perfusionsgeschwindigkeit gesteigert werden und bei Temperaturen über 26°C ein venöser Gegendruck von 5 - 10 cm H₂O erzeugt werden bei einem Durchfluß von 4 - 6 ml/g x Min. (Kessler und Schubotz, 1968).

Die Steigerung der Durchflußrate bei Gegendruck birgt jedoch die Gefahr einer Ausweitung des Gefäßsystems und der Ausbildung interstitieller Ödeme in sich. Durch den Rückstau des Lymphstroms fließt zusätzlich vermehrt Perfusat über die Leberoberfläche ab und zerreißt dabei das Gewebe (Scholz, 1968, a).

Da unsere Versuche bei 30°C und einem Durchfluß von ca. 3 ml/g x Min. mit einem negativen venösen Druck durchgeführt wurden, könnte bei einem Vergleich mit den vorgenannten Forderungen für eine ausreichende Sauerstoffversorgung (Kessler und Schubotz, 1968) schon bei maximaler Sauerstoffsättigung des zuführenden Mediums eine partielle Gewebshypoxie herrschen.

Die in unseren Versuchen unter optimaler Sauerstoffversorgung gefundene geringe Azospaltung von Neoprontosil könnte mit einer solchen partiellen Gewebshypoxie in Verbindung stehen. Die Azospaltung von Neoprontosil würde dann unter in vivo-Bedingungen bei der besseren Versorgung des Lebergewebes mit Sauerstoff in Gegenwart von Erythrocyten keine Bedeutung haben. Außerdem haben Gingell und Mitarbeiter (1971) an Ratten beobachtet, daß das wasserlösliche Neoprontosil nur wenig vom Darm resorbiert wird. Der größte Teil unterliegt vor der Resorption einer Azospaltung durch die Darmbakterien. Die Bakterien und nicht der Organismus wären nach diesen Befunden der wichtigste Aktivator des Neoprontosils zum antibakteriell wirksamen Sulfanilamid.

Im System der isolierten Leber könnte die Azospaltung von Neoprontosil als Indikator von Gewebshypoxien dienen. In Abb. 1 zeigt sich eine mit abnehmendem Sauerstoffangebot zunehmende Bildung von freiem Sulfanilamid. Dabei wird eine ausgeprägte Azospaltung bereits bei 300 Torr im "arteriellen" Schenkel des Systems sichtbar; sie erreicht bei einem Sauerstoffdruck von 200 Torr die maximale Aktivität wie unter anoxischen Perfusionsbedingungen. Daß bei Einführung hypoxischer Perfusionsbedingungen lediglich die Konjugatbildung gehemmt wird, wodurch der freie Anteil an Sulfanilamid bei gleichbleibender Azospaltung ansteigen würde, scheint nach Abb. 6 nicht wahrscheinlich. Es kann ebenfalls nicht angenommen werden, daß zum Zeitpunkt der Hypoxie die Substratkonzentration für die Azospaltung relativ erhöht ist, da nach Abb. 7 ein oxydativer Stoffwechsel des Neoprontosils für die Abnahme im Medium von Neoprontosil keine Rolle spielen dürfte.

2. Azospaltung von Neoprontosil an der isolierten Leber in Gegenwart von Metyrapon bzw. Äthanol

Die Steigerung der Neoprontosilspaltung durch Hypoxie führte zu der Frage, ob auch eine auf anderem Wege als durch Anoxie (Schimassek, 1963) herbeigeführte Reduktion der Pyridinnucleotide die Azospaltung zu beschleunigen vermag.

Als Parameter des Redoxzustandes der Pyridinnucleotide des Lebergewebes gelten der Lactat/Pyruvat-Quotient für das Cytoplasma (Bücher und Klingenberg, 1958) und der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient für den mitochondrialen Raum (Klingenberg und v. Häfen, 1963). Der Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide läßt sich fluorometrisch an der Leberoberfläche messen (Scholz, 1968 b)

Sowohl Metyrapon (Kahl und Netter, 1970; Kahl und Simon, 1971) als auch Äthanol (Forsander, 1966) besitzen eine die Reduktion der Pyridinnucleotide begünstigende Wirkung. Metyrapon führt in einer Konzentration von 5 mM zu einer erheblichen Hemmung der mitochondrialen Atmung, die sich an der isolierten Leber in einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs auf die Hälfte auswirkt (Kahl und Simon, 1971). Metyrapon in einer Konzentration von 1 mM zeigte keinen Einfluß auf die reduktive Spaltung von Neoprontosil. Auch in einem Versuch mit einer höheren Metyraponkonzentration von 5 mM ließ sich keine Steigerung der Azospaltung nachweisen.

Auch die Zugabe von Äthanol verursacht eine rasche Reduktion der Flavine und der Pyridinnucleotide in der perfundierten Leber (Williamson et al., 1969). Zusätzlich wird ein Zuwachs des Sauerstoffverbrauchs um etwa 5% der Gesamtatmung beobachtet (Scholz et al., 1971). Zur Umwandlung von Äthanol in Acetat durch NAD- oder NADPH-abhängige Oxydation sind äquimolare Konzentrationen von Sauerstoff notwendig (ebd.). Die Oxydierung des Äthanol zum Acetaldehyd wird grundsätzlich durch drei Reaktionsmechanismen ermöglicht : die Alkoholdehydrogenase, die Katalase und das mikrosomale Äthanol-oxydierende System (MEOS) (Hawkins und Kalant, 1972). Für eine Beteiligung der mischfunktionellen Oxydation an der Äthanol-oxydation rechnen Scholz und Mitarbeiter (1971) mit nicht mehr als 10% des gesamten Äthanolstoffwechsels bei Perfusion mit niedrigen Äthanolkonzentrationen. Im Experiment der Abb. 4 zeigt sich eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme des isolierten Organs nach Gabe einer hohen Äthanolkonzentration

um etwa 30%. Eine Beschleunigung der Azospaltung durch Äthanol ließ sich in unseren Versuchen nicht feststellen. Damit wird es wenig wahrscheinlich, daß der hypoxiebedingte Effekt auf die Neoprontosilreduktion in einer vermehrten Bereitstellung von reduzierten Pyridinnucleotiden seine Erklärung findet.

3. Hemmung der Neoprontosilreduktion durch Kohlenmonoxid und ihre Reaktivierung durch Metyrapon

Untersuchungen zur Wirkung des Kohlenmonoxids auf die Azoreduktion von Neoprontosil haben für isolierte Lebermikrosomen - abhängig von der Substratkonzentration - eine 30 - 40%ige Hemmung (Wright und Gillette, 1964; Hernandez et al., 1967, b) bzw. eine 76%ige Hemmung (Lier, 1972) ergeben. In unseren Versuchen an der isoliert perfundierten Leber (Abb. 5) läßt sich nach Kohlenmonoxidbegasung des Perfusionsmediums keine weitere Bildung von freiem Sulfanilamid trotz nicht limitierter Substratkonzentration feststellen. Dagegen kommt es unter Kohlenmonoxid zu einer Abnahme der vorhandenen Sulfanilamidmenge, die sich durch Konjugatbildung erklärt (vgl. Abb. 6).

Das genaue Ausmaß der Kohlenmonoxidhemmung ergäbe sich aus einem Vergleich der Geschwindigkeit der Sulfanilamidabnahme unter Kohlenmonoxidbegasung mit derjenigen in den Kontrollversuchen zur Sulfanilamidkonjugation nach Eingabe von Sulfanilamid als Substrat, wie sie in Abb. 6 dargestellt ist. Eine vollständige Hemmung wäre gegeben, wenn unter beiden Bedingungen die gleiche Abnahmegeschwindigkeit erreicht würde, während eine geringere Abnahmegeschwindigkeit auf eine Restaktivität hindeuten würde, die der von Hernandez et al. (1967, b) in vitro beschriebenen extramikrosomalen kohlenmonoxidunempfindlichen Azoreduktase entsprechen könnte. Eine Beurteilung der Abb. 5 und 6 unter diesem Gesichtspunkt zeigt jedoch, daß für eine solche kohlenmonoxidunempfindliche Restaktivität ein relativ kleiner Raum bleibt.

Im Gegensatz zur Neoprontosilreduktion wird die Steroidreduktion (Conney et al., 1968) sowie die Reduktion von Metyrapon (Kahl, 1971) durch Kohlenmonoxid nicht gehemmt. Dagegen verhält sich die Nitroreduktase gegenüber Kohlenmonoxid ähnlich wie die Azoreduktase.

Metyrapon hemmt wie Kohlenmonoxid die mikrosomalen Hydroxylierungsreaktionen in der Leber (Leibman, 1966; Netter et al., 1967). Ebenfalls dem Kohlenmonoxid

analog ist die Bindung des Metyrapons an das reduzierte Cytochrom P-450 (Hildebrandt et al., 1969). Abweichend von der Ähnlichkeit mit dem Kohlenmonoxid ist eine konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkung des Metyrapons auf die Hydroxylierung von Trichloräthylen und Acetanilid. Bei niedrigen Konzentrationen des Metyrapons erfolgt eine Umsatzsteigerung der Acetanilidhydroxylierung, bei höherer dagegen eine Hemmung (Leibman, 1969). Diese in vitro-Befunde ließen sich in vergleichbarer Konzentrationsabhängigkeit am System der isoliert perfundierten Rattenleber bestätigen (Minck et al., 1972).

Abweichend vom Kohlenmonoxid bewirkt Metyrapon keine Hemmung der Neoprontosilreduktion (Tab. 2). Sowohl unter ausreichender Sauerstoffversorgung als auch nach Anoxie zeigt sich keine Veränderung in der Sulfanilamidbildung. Dagegen erfolgt eine Reaktivierung des kohlenmonoxidgehemmten Umsatzes durch Zugabe von 10^{-3} M Metyrapon (Abb. 5). Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden überein, die von Lier (1972) an Rattenlebermikrosomen erhoben wurden; die Übereinstimmung der in vitro- und der semi in vivo-Versuche macht Ansatzpunkte einer Erklärung der reaktivierenden Wirkung des Metyrapons auf mitochondrialer Ebene, etwa durch Bereitstellung einer größeren Menge reduzierender Äquivalente (s. o.), wenig wahrscheinlich.

Die Reaktivierung der kohlenmonoxidgehemmten Reaktion durch Metyrapon kann vermutlich nicht über eine Verdrängung des Kohlenmonoxids vom Cytochrom P-450 durch das Metyrapon gedeutet werden. Denn Kohlenmonoxid besitzt eine viel größere Affinität zur Endoxydase als Metyrapon. Darüberhinaus konnte in in vitro-Versuchen gezeigt werden, daß Kohlenmonoxid das Metyrapon von seinem Bindungsort verdrängt (Hildebrandt et al., 1969). Eine Aussage über den Mechanismus der Reaktivierung läßt sich aus unseren Befunden nicht ableiten.

4. Vergleich der Konzentrationen von Neoprontosil und freiem Sulfanilamid im Perfusionsmedium der isolierten Leber

Während Lier (1972) an isolierten Mikrosomen eine stöchiometrische Übereinstimmung zwischen der Konzentrationsabnahme von Neoprontosil und der Konzentrationszunahme von Sulfanilamid fand, zeigen die Versuche an der isoliert perfundierten Leber (Abb. 7) keine Übereinstimmung zwischen beiden Parametern.

Aus Abb. 7 geht hervor, daß die Elimination von Neoprontosil aus dem Perfusionsmedium bereits in großem Umfang abläuft, während die Konzentration des freien

Sulfanilamids bis zu einem Zeitpunkt von 35 Minuten relativ konstant bleibt.

Ein Teil des Unterschiedes zwischen beiden Parametern in diesem Abschnitt der Perfusion erklärt sich aus der Konjugation von Sulfanilamid (vgl. Abb. 6).

Ab dem Zeitpunkt der Anoxie läßt sich eine bessere Entsprechung der beiden Meßgrößen beobachten. Ab diesem Zeitpunkt erreicht die Zunahme der Konzentration an freiem Sulfanilamid faßt die Abnahmegegeschwindigkeit des Neoprontosils, während die Eliminationskurve des Neoprontosils durch die Einführung hypoxischer Perfusionsbedingungen keine Veränderung erkennen läßt. Es stellt sich die Frage, worin der Unterschied zwischen der Abnahme der Neoprontosilkonzentration und der als freies Sulfanilamid aufgefundenen Metabolitmenge in diesen Perfusionen zu suchen ist.

Als Mechanismus für die Elimination von Neoprontosil aus dem Perfusionsmedium kommen zunächst Verteilungsvorgänge durch Aufnahme des Substrates in das perfundierte Organ in Betracht. Hierfür spricht, daß die initiale Neoprontosilkonzentration schon nach einer Perfusionszeit von wenigen Minuten um 30% erniedrigt ist. In diesem Zeitraum dürfte sich eine Elimination in die Galle noch nicht wesentlich ausgewirkt haben, da die Galle zu diesen frühen Perfusionszeitpunkten noch nicht rot tingiert erschien. Zu späteren Perfusionszeitpunkten dürfte die Ausscheidung in die Galle zur Verminderung der Neoprontosilkonzentration beitragen, da sich eine starke Rotfärbung der Galle beobachten läßt. Das Ausmaß der biliären Ausscheidung organischer Verbindungen ist abhängig vom Molekulargewicht, der Polarität, der chemischen Struktur und der Fettlöslichkeit (Millburn et al., 1967; Hirom et al., 1972). Als Schwellenwert des Molekulargewichtes biliär ausscheidbarer Substrate geben Hirom et al. (1972) für Ratten - dieser Wert ist je nach Spezies unterschiedlich - ca. 325 an. Für alle Spezies besteht über dem Molekulargewicht 500 eine ausgeprägte Ausscheidung in die Galle (ebd.). Neoprontosil hat ein Molekulargewicht von 588.

Gingell und Mitarbeiter fanden 1971 an Ratten, daß das lipidlösliche Prontosil nach oraler und intraperitonealer Applikation nur teilweise über die Galle ausgeschieden wird, und zwar vornehmlich als N-Glucuronid. Das polare wasserlösliche Neoprontosil wird nur wenig vom Intestinum resorbiert und zum größten Teil durch die Darmflora zu Sulfanilamid reduziert, bevor es resorbiert wird. Intraperitoneal gegeben erscheinen mehr als 70% des Neoprontosils unverändert in der

Galle. Nach diesen Versuchen ist bei dem durch die isoliert perfundierte Leber in die Galle ausgeschiedenen Neoprontosil mit einem relativ hohen Anteil unveränderter Substanz zu rechnen.

Ein oxydativer Abbau von Neoprontosil dürfte als Eliminationsmechanismus ausscheiden, da sich die Neoprontosilabnahme annähernd linear über den Perfusionszeitraum verhält und nicht unter anoxischen Bedingungen zum Stillstand kommt. Ein Teil der Diskrepanz zwischen Neoprontosilabnahme und Sulfanilamidbildung wird mit der Konjugation des freien Sulfanilamids zusammenhängen, wie sie sich aus Abb. 6 als Eliminationsweg ergeben hat. Das Ausbleiben einer Veränderung der Neoprontosil-elimination aus dem Medium zum Zeitpunkt eines anoxiebedingten erheblichen Anstiegs der freien Sulfanilamidkonzentration schließt aus, daß sich in einer direkten Messung der Neoprontosilkonzentration ein wesentlicher Teil der Kapazität der Leber zur Azospaltung erfassen läßt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei guter Sauerstoffversorgung zeigt die isolierte Leber nur eine sehr geringe Kapazität zur Azoreduktion von Neoprontosil. Mit abnehmendem Sauerstoffpartialdruck im einströmenden Medium nimmt der Anteil des aus dem Neoprontosil gebildeten freien Sulfanilamids zu. Der Schwellenwert, ab dem die verminderte Sauerstoffversorgung eine vermehrte Azospaltung in Gang bringt, liegt bei einem Sauerstoffpartialdruck von 300 Torr im zuführenden Schenkel. Bereits ab 200 Torr wird eine Neoprontosilspaltung beobachtet, die den Werten unter maximaler Anoxie entspricht. Metyrapon in einer Konzentration von 1mM und Äthanol in einer Konzentration von 38 mM führen unter Sauerstoff nicht zu einer verstärkten Azoreduktion von Neoprontosil. Nach Äthanol wird eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches der isolierten Leber beobachtet, die etwa 30% der Leberatmung vor der Äthanolzugabe entspricht.
2. Nach Begasung des Mediums mit Kohlenmonoxid wird die maximale Neoprontosilreduktion unter anoxischen Bedingungen stark gehemmt. Die anschließende Zugabe von Metyrapon in einer Konzentration von 1mM führt zu einer teilweisen Reaktivierung der kohlenmonoxidgehemmten Neoprontosilreduktion. Die Zugabe von 1mM Metyrapon vor einer vorangegangenen Begasung des Mediums mit Kohlenmonoxid führt weder bei ausreichender Sauerstoffversorgung der Leber bei einem Partialdruck von 650 Torr im zuführenden Schenkel noch unter anoxischen Perfusionsbedingungen zu einer Beeinflussung der Sulfanilamidbildung.
3. Wird der isolierten Leber Sulfanilamid als Substrat angeboten, läßt sich eine Verminderung der Konzentration an Sulfanilamid beobachten, die während einer Perfusionszeit von 35 Minuten etwa ein Drittel der ursprünglichen Konzentration ausmacht. Diese verschwundene Menge läßt sich durch saure Hydrolyse wiederfinden, so daß die Abnahme des freien Sulfanilamids auf Konjugationsprozessen beruhen dürfte. Diese Konjugationsprozesse des Sulfanilamids laufen unter Sauerstoff, in Anoxie sowie unter Begasung mit Kohlenmonoxid etwa gleich stark ab. Dabei läßt sich eine Tendenz zur Abhängigkeit der Konjugationsprozesse von der Substratkonzentration beobachten.

4. Bei gleichzeitiger Messung der Abnahme des Neoprontosils und der Zunahme des gebildeten freien Sulfanilamids läßt sich keine Übereinstimmung zwischen beiden Parametern auffinden. Die Differenz in den beiden Meßergebnissen schließt die kontinuierliche Messung der Neoprontosilabnahme als geeigneten Parameter zur Erfassung der Azospaltung aus.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMSON, R. H., R. L. DIXON, F. L. FRANCIS and D. P. RALL : Comparative biochemistry of drug metabolism by azo and nitro reductase.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1386 (1965)
- ADELSTEIN, S. J. and B. L. VALLEE : Zinc in beef liver glutamic dehydrogenase.
J. biol. Chem. 233, 589 (1958)
- ARCOS, J. C., A. H. CONNEY and N. P. BUU-HOI : Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes.
J. biol. Chem. 236, 1291 (1961)
- AXELROD, J. : The enzymatic conversion of codeine to morphine .
J. Pharmacol. exp. Ther. 115, 259 (1955)
- BAHR, Ch. v., B. P. LISBOA and S. ORRENIUS : Influence of phenobarbital pretreatment on the in vitro ring A reduction of Δ^4 -3-oxo-steroids in rat liver microsomes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 264, 420 (1969)
- BERNHEIM, F. : The reduction of neoprontosil by tissues in vitro.
J. Pharmacol. exp. Ther. 71, 344 (1941)
- BRATTON, A. C. and E. K. MARSHALL : A new coupling component for sulfanilamid determination.
J. biol. Chem. 128, 537 (1939)
- BRAY, H. G., R. C. CLOWES and W. V. THORPE : The metabolism of azobenzene and p-hydroxyazobenzene in the rabbit.
Biochem. J. 49, 65 (1951)
- BRODIE, B. B. and J. AXELROD : The fate of acetanilide in man.
J. Pharmacol. exp. Ther. 94, 29 (1948)
- BRODIE, B. B., J. R. GILLETTE and B. N. LA DU : Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds.
Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)

- BROWN, R.R., J.A. MILLER and E.C. MILLER : The metabolism of methylated aminoazo IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro.
J. biol. Chem. 209, 211 (1954)
- BURBA, J.V. : Influence of several drugs on the in vivo and in vitro activity of mammalian hepatic azoreductase.
Canad. J. Biochem. 46, 367 (1968)
- BÜCHER, Th. und M. KLINGENBERG : Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation.
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
- CARLSON, G.P. and K.P. DuBOIS : Studies on the induction of nitroreductase activity by DDT and phenobarbital.
Toxicol. appl. Pharmacol. 17, 203 (1970)
- CLAUDE, A. : A fraction from normal chick embryo similar to the tumor producing fraction of chicken tumor I.
Proc. Soc. exp. biol. Med. 39, 398 (1938)
- CONNEY, A.H. : Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)
- CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL and J. J. BURNS : Adaptive increases in drug metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 1 (1960)
- CONNEY, A.H., W. LEVIN, M. IKEDA, R. KUNTZMAN, D. Y. COOPER and O. ROSENTHAL : Inhibitory effect of carbon monoxide on the hydroxylation of testosterone by rat liver microsomes.
J. biol. Chem. 243, 3912 (1968)
- CONNEY, A.H., E.C. MILLER and J.A. MILLER : The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. : Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene.
Cancer. Res. 16, 450 (1956)
- DECKEN, A. VON DER, and T. HULTIN : Inductive effects of 3-methylcholanthrene on enzyme activities and amino acid incorporation capacity of rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 90, 201 (1960)

- DIXON, R.L., R.W. SHULTICE and J.R. FOUTS : Factors affecting drug metabolism by liver microsomes. IV. Starvation.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 103, 333 (1960)
- DOMAGK, G. : Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen.
Dtsch. med. Wschr. 61, 250 (1935)
- DÜNGES, W. and G.F. KAHL : Metabolism of metyrapone by a soluble enzyme system in rat liver.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 267, 293 (1970)
- ELSON, L.A. and F.L. WARREN : The metabolism of azo compounds.
Biochem. J. 38, 217 (1944)
- ERICKSON, R.E., R.J. ERTEL and F. UNGAR : Effect of Su-4885 on steroid 18-hydroxylation in the mouse adrenal in vitro.
Endocrinology 78, 343 (1966)
- ESTABROOK, R.W., D.Y. COOPER and O. Rosenthal : The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex.
Biochem. Z. 338, 741 (1963)
- FELLER, D.R., M. MORITA and J.R. GILLETTE : Enzymatic reduction of niridazole by rat liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 20, 203 (1971)
- FIESER, L.F. and M. FIESER : Organic Chemistry, 3rd. ed., Boston, 1956;
zit. nach J.R. GILLETTE: Reductive enzymes. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Berlin, Heidelberg, New York, 28/2, 349 (1971)
- FOUTS, J.R. and B.B. BRODIE : The enzymatic reduction of chloramphenicol p-nitrobenzoic acid and other aromatic nitro compounds in mammals.
J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 197 (1957)
- FOUTS, J.R., J.J. KAMM and B.B. BRODIE: Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes.
J. Pharmacol. exp. Ther. 120, 291 (1957)
- FORSANDER, O.A. : Influence of the metabolism of ethanol on the lactate/pyruvate ratio of rat-liver slices.
J. Biochem. 98, 244 (1966)

- FRIEDMAN, S. and S. KAUFMAN: 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine β -hydroxylase.
J. biol. Chem. 240, 4763 (1965)
- FULLER, A. T.: Is p-aminobenzene sulfonamide the active agent in prontosil therapy ?
Lancet 1, 194 (1937)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I.: Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 (1958)
- GILLETTE, J. R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanism.
Fortschr. Arzneimittelforsch. 6, 11 (1963)
- GILLETTE, J. R.: Comment to the paper of KIESE (1965).
Ann. N. Y. Acad. Sci. 123, 154 (1965)
- GILLETTE, J. R.: Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum.
Advanc. Pharmacol. 4, 219 (1966)
- GILLETTE, J. R.: Reductive enzymes.
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Berlin, Heidelberg, New York, 28/2, 349 (1971)
- GILLETTE, J. R., B. B. BRODIE and B. N. LA DU : The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen.
J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 532 (1957)
- GILLETTE, J. R. and J. J. KAMM : The enzymatic formation of sulfoxides: the oxidation of chlorpromazine and 4, 4-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes.
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 262 (1960)
- GILLETTE, J. R., J. J. KAMM and H. A. SASAME : Mechanism of p-nitrobenzoate reduction in liver: the possible role of cytochrome P-450 in liver microsomes.
Molec. Pharmacol. 4, 541 (1968)
- GINGELL, R., J. W. BRIDGES and R. T. WILLIAMS : Gut flora and the metabolism of prontosil in the rat.
J. Biochem. 114, 5 (1969)

- GINGELL, R., J.W. BRIDGES and R.T. WILLIAMS : The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat.
Xenobiotica 1, 143 (1971)
- GINGELL, R. and R. WALKER : Mechanism of azo reduction by streptococcus faecalis .II. The role of soluble flavins.
Xenobiotica 1, 231 (1971)
- GOLDBERG, L.: The toxicology of artificial colourin materials.
J. Soc. Cosmetic Chemists 18, 421 (1967)
- GOVIER, W.C.: Reticuloendothelial cells as the site of sulfanilamide acetylation in the rabbit.
J. Pharmacol. exp. Ther. 150, 305 (1965)
- HAWKINS, R.D. and H. KALANT : The metabolism of ethanol and its metabolic effects.
Pharmacol. Rev. 24, 67 (1972)
- HEMS, R., B.D. ROSS, M.N. BERRY and H.A. KREBS : Gluconeogenesis in the perfused rat liver.
Biochem. J. 101, 284 (1966)
- HERNANDEZ, P.H., J.R. GILLETTE and P. MAZEL:
- a) Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. I.: Azoreductase activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c-reductase.
Biochem. Pharmacol. 16, 1859 (1967)
 - b) Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. II.: The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities.
Biochem. Pharmacol. 16, 1877 (1967)
- HILDEBRANDT, A.G. and R.W. ESTABROOK : Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 143, 66 (1971)
- HILDEBRANDT, A.G., K.C. LEIBMAN and R.W. ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital.
Biochem. biophys. Res. Commun. 37, 477 (1969)

HIROM, P.C., P.MILLBURN, R.L.SMITH and R.T.WILLIAMS:

a) Molecular weight and chemical structure as factors in the biliary excretion of sulfanilamides in the rat.

Xenobiotica 2, 205 (1972)

b) Species variations in the threshold molecular weight factor for the biliary excretion of organic anions.

Biochem.J. 129, 1071 (1972)

JUCHAU, M.R. : Studies on the reduction of aromatic nitro groups in human and rodent placental homogenates.

J.Pharmacol.exp.Ther. 165, 1 (1969)

KAHL, G.F. : Untersuchungen zu Stoffwechsel und Wirkung von Metyrapon in der Leberzelle.

Med.Habilschr. , Mainz, 1970

KAHL, G.F. and K.J.NETTER : The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxydation.

Biochem.Pharmacol. 19, 27 (1970)

KAHL, G.F. and S.SIMON : Action of metyrapone on the redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide and on oxygen consumption of perfused rat livers and isolated mitochondria.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 268, 1 (1971)

KAMM, J.J. and J.R.GILLETTE : Studies on the mechanism of microsomal nitro reductase.

Fed.Proc. 22, 366 (1963)

KATO, R. and T. OSHIMA : Intracellular localisation and cofactor requirement of nitroreductase in rat liver.

Jap.J.Pharmacol. 18, 369 (1968)

KATO, R., T. OSHIMA and A. TAKANAKA : Studies on the mechanism of nitro reduction by rat liver.

Molec.Pharmacol. 5, 487 (1969)

KEILIN, D. and T.MANN : Polyphenol oxidase.Purification, nature and properties.

Proc.roy.Soc.B. 125, 187 (1938)

- KESSLER, M. und R. SCHUBOTZ : Die Sauerstoffversorgung der hämoglobinfrei perfundierten Leber.
In: W. STAIB und R. SCHOLZ (Hsg.) : Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, 12
- KETTERER, B., P. ROSS-MANSELL and H. DAVIDSON : The effect of the administration of N,N-dimethyl-4-amino-azobenzene (DAB) on the activity of DAB-reductase and NADPH-cytochrome c-reductase.
Chem. Biol. Interactions 2, 183 (1970)
- KIESE, M., C. SCHNEIDER und H. D. WALLER : Hämoglobinreduktase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 231, 158 (1957)
- KLEIN, J. R. and J. S. HARRIS : The acetylation of sulfanilamide in vitro.
J. biol. Chem. 124, 613 (1938)
- KLINGENBERG, M. : Pigments of rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 (1958)
- KLINGENBERG, M. und H. von HÄFEN : Wege des Wasserstoffs in Mitochondrien.
I. Die Wasserstoffübertragung von Succinat zu Acetoacetat.
Biochem. Z. 337, 120 (1963)
- KRAULIS, I. and M. K. BIRMINGHAM : Hydroxylation sequences in rat adrenal steroids and effects of Su 4885 on C₁₈-oxygenation.
Fed. Proc. 22, 530 (1963)
- KRAULIS, I., H. TRAIKOV, M. P. LI, C. P. LANTOS and M. K. BIRMINGHAM : The reduction of Su-4885 by adrenal glands and other tissues and its inhibition by ACTH.
Canad. J. Biochem. 46, 463 (1968)
- LaDU, B. N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF and B. B. BRODIE : Enzymatic dealkylation of aminopyrine (pyramidon) and other alkylamines.
J. biol. Chem. 214, 741 (1955)
- LEIBMAN, K. C. : Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations.
Molec. Pharmacol. 5, 1 (1969)
- LEIBMAN, K. C. : Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations.
Fed. Proc. 25, 417 (1966)

- LELLING, B.: Untersuchungen zum Stoffwechsel und zum atemdepressiven Effekt von Metyrapon an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Medizinische Dissertation , Mainz 1971
- LIDDLE, G.W., H.L.ESTEP, J.W.KENDALL, W.C.WILLIAMS and A.W.TOWNES :
Clinical application of a new test of pituitary reserve.
J.clin.Endocr. 19, 875 (1959)
- LIDDLE, G.W., D.ISLAND, H.ESTEP and G.M.TOMKINS : Modification of adrenal steroid patterns in man by means of an inhibitor of 11- β -hydroxylase.
J.clin. Invest. 37, 912 (1958)
- LIER, A.: Zur Frage der Beeinflussung des oxidativen und reduktiven Fremdstoffumbaus in den Mikrosomen der Rattenleber durch Metyrapon.
Medizinische Dissertation , Mainz 1972
- LUCHSINGER, B.: Medizinische Dissertation, Zürich 1875 ; zit. nach: H.DECHER:
Beeinflussbarkeit des Arzneimittelstoffwechsels durch Mikrosomen-Hemmstoffe.
Medizinische Dissertation , Mainz 1970
- MARSHALL, E.K.Jr., W.C.CUTTING and K.EMERSON : Acetylation of para-aminobenzene sulfonamide in the animal organism.
Science 85, 202 (1937)
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism.
Advances Enzymol. 19, 79 (1957)
- MAZEL, P. and P.H. HERNANDEZ: The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on CO sensitive and insensitive azoreductase activities.
Fed.Proc. 26, 461 (1967)
- MILLBURN, P., R.L.SMITH and R.T.WILLIAMS: Biliary excretion of foreign compounds. Biphenyl, stilboestrol and phenol in the rat. Molecular weight, polarity and metabolism as factors in biliary excretion.
Biochem.J. 105, 1275 (1967)
- MILLER, L.L., C.G.BLY, M.L.WATSON and W.F.BALE: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine- ϵ -C¹⁴.
J.exp.Med. 94, 431 (1951)
- MINCK, K., G.F.KAHL, R.KERN, A.LIER and G.NISSEN: Influence of metyrapone and hypoxia on neoprontosil and acetanilide metabolism in isolated rat livers.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 274, Suppl., R 79 (1972)

- MITOMA, C., H.S.POSNER, H.C.REITZ and S.UDENFRIEND : Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Arch.Biochem.Biophys. 61, 431 (1956)
- MORITA, M., D.R.FELLER and J.R.GILLETTE : Reduction of niridazole by rat liver xanthine oxidase.
Biochem.Pharmacol. 20, 217 (1971)
- MUELLER, G.C. and J.A.MILLER : The reductive cleavage of 4-dimethylamino-azobenzol by rat liver : The intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for TPN.
J.biol.Chem. 180, 1125 (1949)
- MUELLER, G.C. and J.A.MILLER : The reductive cleavage of 4-dimethylamino-azobenzol by rat liver : Reactivation of carbon dioxide-treated homogenates by riboflavin adenine dinucleotide.
J.biol.Chem. 185, 145 (1950)
- NETTER, K.J. : Eine Methode zur direkten Messung der O-Demethylierung und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A .
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 238, 292 (1960)
- NETTER, K.J., S.JENNER und K.KAJUSCHKE : Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittelabbau.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 259, 1 (1967)
- OMURA, T. and R.SATO : A new cytochrome in liver microsomes.
J.biol.Chem. 237, 1375 (1962)
- PALADE, G.E. : Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures.
In: O.H.GAEBLER (Ed.) : Enzymes, units of biological structure and function.
New York 1956, 185
- PECHTHOLD, F. : Zur Kenntnis des Abbaues von Dimethylaminophenyldimethylpyrazolon im Organismus.
Arzneimittel-Forsch. 14, 972 (1964)
- REMMER, H. und H.J.MERKER : Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal).
Klin.Wschr. 41, 276 (1963)
- REMMER, H.J., J.B.SCHENKMAN, R.W.ESTABROOK, H.SASAME, J.R.GILLETTE, D.Y.COOPER, S.NARASIMHULU and O.ROSENTHAL : Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Molec.Pharmacol. 2, 187 (1966)

- ROXAN, J.J., A.J. RYAN and S.E. WRIGHT : Enzymatic reduction of tartrazine by proteus vulgaris from rats.
Food Cosmet. Toxicol. 5, 645 (1967)
- SANZARI, N.P. and F.G. PERON : Influence of metopirone on substrate-supported hydroxylation of DOC by rat adrenal mitochondria.
Steroids 8, 929 (1966)
- SASAME, A.H. : Unpublished results 1969 .
zit. nach J.R. GILLETTE: Reductive enzymes. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie , Berlin, Heidelberg, New York, 28/2, 349 , 1971
- SASAME, H.A. and J.R. GILLETTE : Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes.
Molec. Pharmacol. 5, 123 (1969)
- SCHENKMAN, J.B., H. REMMER and R.W. ESTABROOK : Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Molec. Pharmacol. 3, 113 (1967)
- SCHIMASSEK, H. : Regulation of lactate and pyruvate levels in the perfusion medium by the isolated rat liver.
Life Sci. 11, 635 (1962)
- SCHIMASSEK, H. : Metabolite des Kohlehydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber.
Biochem. Z. 336, 480 (1963)
- SCHOLZ, R. :
a) Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.
In: W. STAIB und R. SCHOLZ (Hsg.) : Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. Berlin, Heidelberg, New York , 1968 , 25
b) Oberflächenfluorometrie .
In: W. STAIB und R. SCHOLZ (Hsg.) : Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. Berlin, Heidelberg, New York , 1968 , 33

- SCHOLZ, R. and T. BÜCHER : Hemoglobinfree perfusion of rat liver.
In: B. CHANCE, R. W. ESTABROOK and J. R. WILLIAMSON (Eds.): Control
of energy metabolism. New York , 1965 , 393
- SCHOLZ, R., W. HANSEN and R. G. THURMAN : Interaction between ethanol oxidation
and drug metabolism.
In: G. A. MARTINI and C. BODE (Eds.): Metabolic changes induced by alcohol.
Berlin, Heidelberg, New York , 1971 , 101
- SHARGEL, L.: The mechanism of flavin stimulation of microsomal and purified
azoreductase.
Fed. Proc. 26, 461 (1967)
- SHARGEL, L. and MAZEL, P.: The effects of flavins on purified and microsomal
azoreductase.
Toxicol. appl. Pharmacol. 12, 317 (1968)
- SISLEY, P. and C. PORCHER : Du sort des matières colorantes dans l'organisme animal.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 152, 1062 (1911)
- SPRUNT, J. G., M. C. K. BROWNING and D. M. HANNAH : Some aspects of the
pharmacology of metyrapone.
Mem. Soc. Endocr. 17, 193 (1967)
- STAIB, W. und R. SCHOLZ : Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber.
Berlin, Heidelberg, New York , 1968
- STEVENSON, E. S., K. D. OBRINER and C. P. RHOADS : The metabolism of
dimethylaminobenzene (butter yellow) in rats.
Cancer Res. 2, 160 (1942)
- STRITTMATTER, C. F. and E. G. BALL : The intracellular distribution of cytochrome
components and of oxidative enzyme activity in rat liver.
J. cell. comp. Physiol. 43, 57 (1954)
- THOMPSON, J. H.: Chemotherapeutic agents.
In: BEVAN, J. A. (Ed.): Essentials of Pharmacology. New York, Evanston,
London, 1969 , 486
- TREFOUEL, J., MME. J. TREFOUEL, F. NITTI et D. BOVET : Activité du p-amino-
phénylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris
et du lapin.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 120, 756 (1935)

WALKER, R.: The metabolism of azo compounds : A review of the literature.

Food Cosmet. Toxicol. 8, 659 (1970)

WILLIAMSON, J.R., R. SCHOLZ, E.T. BROWNING, R.G. THURMAN and

M.H. FUKAMI : Metabolic effects of ethanol in perfused rat liver.

J. biol. Chem. 244, 5044 (1969)

WRIGHT, S.E. and J.R. GILLETTE : Unpublished results, 1964 ;

zit.nach: J.R. GILLETTE: Reductive enzymes. In: Handbuch der experimentellen

Pharmakologie , Berlin, Heidelberg, New York , 28/2, 349 (1971)

LEBENS LAUF

Am 23. Oktober 1942 wurde ich in Königsberg/Ostpreußen als zweites Kind des damaligen Assesors und späteren Rechtsanwalts und Notars Dr. Erich Kern und seiner Ehefrau Kätthe, geb. Schröter, geboren.

Nach der Vertreibung aus Ostpreußen wohnte meine Familie in Parchim/Mecklenburg, wo ich elf Jahre zur Schule ging. Nachdem meine Eltern 1960 ihren Wohnsitz nach Koblenz verlegt hatten, setzte ich meinen Schulbesuch am staatlichen Gymnasium in Bad Neuenahr fort und legte dort 1962 die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich 1962 an der Universität Mainz. Dort bestand ich 1965 die ärztliche Vorprüfung und legte die ärztliche Prüfung im Juli 1968 ab. Nach einer zweijährigen Tätigkeit als Medizinalassistentin an der Universitätsklinik Mainz und dem Evangelischen Krankenhaus Oberhausen erhielt ich am 1. Januar 1970 die ärztliche Approbation.

Nach Aufnahme der pädiatrischen Facharztausbildung in Oberhausen unterbrach ich 1970 die klinische Ausbildung, um am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz die Promotionsarbeit anzufertigen. Seit Mai 1972 setze ich die Facharztausbildung an der Universitätskinderklinik Mainz fort.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12